

Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**SİTOTOKSİK AJANLARLA MUAMELE EDİLEN MCF-7
MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA BAZI
KODLAMAYAN RNA'LARIN HÜCRESEL VE
EKSOZOMAL İFADE DÜZEYLERİNİN İNCELENMESİ**

OĞUZ KOLDEMİR

**DANIŞMAN
PROF. DR. UĞUR GEZER**

**TEMEL ONKOLOJİ ANA BİLİM DALI
ONKOLOJİK BİYOLOJİ VE İMMÜNOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2017

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Onkolojik Biyoloji ve İmmünoloji Bilim Dalı Programında Yüksek Lisans öğrencisi Oğuz KOLDEMİR tarafından Prof.Dr.Uğur GEZER'in danışmanlığında hazırlanan "Sitotoksik ajanlarla muamele edilen MCF-7 meme kanseri hücre hattında bazı kodlamayan RNA'ların hücresel ve eksozomal ifade düzeylerinin incelenmesi" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 14/03/2017 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



Jüri Başkanı
Prof.Dr.Vildan YASASEVER
İ.Ü.Onkoloji Enstitüsü
Temel Onkoloji Anabilim Dalı



Jüri-Danışman
Prof.Dr.Uğur GEZER
İ.Ü.Onkoloji Enstitüsü
Temel Onkoloji Anabilim Dalı



Jüri
Prof.Dr.Derya DURANYILDIZ
İ.Ü.Onkoloji Enstitüsü
Temel Onkoloji Anabilim Dalı



Jüri
Doç.Dr.Vakur OLGAC
İ.Ü.Onkoloji Enstitüsü
Klinik Onkoloji Anabilim Dalı



Jüri
Y.Doç.Dr.Elif Zeynep YILMAZ
Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Oğuz KOLDEMİR



İTHAF

Anneme ithaf ediyorum



TEŞEKKÜR

İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Müdürümüz Sn. Prof. Dr. Ahmet KİZİR'e,

Anabilim Dalı Başkanımız saygıdeğer hocamız Sn. Prof. Dr. Vildan YASASEVER'e,

Çalışmamda bana yol gösteren, hiçbir konuda yardımını ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Sn. Prof. Dr. Uğur GEZER'e,

Değerli hocalarım Prof. Dr. Hülya YAZICI ve Doç. Dr. Semra DEMOKAN'a,

Katkıları ve Destekleri için Dr. Ebru Esin YÖRÜKER'e,

Çalışmalarım sırasında bana yol gösteren ve sürekli destekleyen başta Emre ÖZGÜR olmak üzere, Biyolog Zübeyde Yalnız KAYIM'a, Uzm. Biyologlar Buğra Tunçer'e, Demet Akdeniz ÖDEMİŞ'e ve anabilim dalımızda bulunan diğer tüm yüksek lisans ve doktora öğrenci arkadaşlarıma,

Hayatımın her döneminde olduğu gibi, bu aşamada da beni maddi ve manevi olarak var gücüyle destekleyen canım annem Saime KAYAK'a, ablam Özlem KOLDEMİR'e ve yeğenim Tekin PİRE'ye teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	Vİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	İX
ÖZET	X
ABSTRACT.....	Xİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	15
4. BULGULAR.....	25
5. TARTIŞMA	39
KAYNAKLAR	44
FORMLAR	53
ETİK KURUL KARARI	54
ÖZGEÇMİŞ	55

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3.1 cDNA Reaksiyon Bileşenleri.....	21
Tablo 3.2 cDNA Reaksiyon Koşulları.....	21
Tablo 3.3 GZ-PZR Reaksiyon Bileşenleri.....	22
Tablo 3.4 lncRNA molekülleri ve Referans Gene Ait Primer Dizileri.....	22
Tablo 4.1 Sitotoksik ajan uygulanan hücrelerin rölatif hücre indeksi ve apoptoz.....	26
Tablo 4.2 MCF-7 hücrelerinde göreceli lincrna-p21 ve GAS5 ifade düzeyleri.....	30
Tablo 4.3 MDA-MB-231 hücrelerinde lincrna-p21 ve GAS5 ifade düzeyi.....	31
Tablo 4.4 MCF-7 hücrelerinden salınan eksozomlarda lincrna-p21 ve GAS5 ifadesi.....	33
Tablo 4.5 MDA-MB-231 hücrelerinden salınan eksozomlarda lincrna-p21 ve GAS5 ifadesi.....	35

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Kanserle ilişkilendirilmiş bazı lncRNA moleküllerine ait sinyal yolakları.....	8
Şekil 2.2: lincrna-p21'in düzenlenmesinde görev aldığı sinyal yolakları.....	10
Şekil 4.1: Sitotoksik ajan uygulanmış MCF-7 hücrelerinin hücre indeksi.....	26
Şekil 4.2: Sitotoksik ajan uygulanmış MDA-MB-231 hücre indeksi.....	26
Şekil 4.3: MCF-7 hücrelerinde göreceli apoptoz düzeyi.....	28
Şekil 4.4: MDA-MB-231 hücrelerinde göreceli apoptoz düzeyi.....	28
Şekil 4.5: GAS5, lincrna-p21 ve GAPDH'a ait çoğalma eğrileri.....	29
Şekil 4.6: GAS5, lincrna-p21 ve GAPDH'a ait eğrime eğrileri.....	30
Şekil 4.7: MCF-7 hücrelerinde lincrna-p21 ifade düzeyleri.....	31
Şekil 4.8: MCF-7 hücrelerinde GAS5 ifade düzeyleri.....	32
Şekil 4.9: MDA-MB-231 hücrelerinde lincrna-p21 düzeyleri.....	33
Şekil 4.10: MDA-MB-231 hücrelerinde GAS5 düzeyleri.....	33
Şekil 4.11: MCF-7 eksozomlarında lincrna-p21 ifade düzeyleri.....	36
Şekil 4.12: MCF-7 eksozomlarında GAS5 ifade düzeyi.....	36
Şekil 4.13: MDA-MB-231 eksozomlarında lincrna-p21 ifade düzeyleri.....	38
Şekil 4.14: MDA-MB-231 eksozomlarında GAS5 ifade düzeyleri.....	38

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

NcRNAs: Non-coding RNAs
LncRNAs: Long non-coding RNAs
MCF-7: Michigan Cancer Foundation-7
lincrna-p21: Long intergenik non-coding RNA p21
GAS5: Growth Arrest Spesific-5
GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
PR: Progesteron Reseptör
ER: Östrojen (Estrogen) Reseptör
HER: İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
GRE: Glukokortikoid Reseptör Element
APC: Adenomatous polyposis coli
hnRNP-K: Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K
TNBC: Üçlü Negatif Meme Kanseri
PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ENCODE: Encyclopedia of DNA Elements
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
FBS: Fetal Bovin Serum
T/E: Tripsin/ EDTA solüsyonu
P/S: Streptomisin/Penisilin
DNA: Deoksiribo Nükleik Asit
RNA: Ribo Nükleik Asit
mRNA: Mesajcı RNA
rRNA: Ribozomal RNA
snRNA: Ufak nüklear RNA
snoRNA: Ufak nükleolar RNA
piRNA: Piwi-interacting RNA
miRNA: Mikro RNA
MVE: Mikrovesiküler endozom
Tak: Taksol (Paklitaksel)
Bleo: Bleomisin

ÖZET

Koldemir, O. (2017). Sitotoksik Ajanlarla Muamele Edilen MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattında Bazı Kodlamayan RNA'ların Hücresel ve Eksozomal İfade Düzeylerinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji ABD., Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

Genomda protein kodlamayan genler “kodlamayan RNA’lar” (ncRNA’lar) olarak adlandırılırlar. 200 nükleotitten uzun olan ncRNA’lar “Uzun kodlamayan RNA’lar” (lncRNAs) olarak isimlendirilmiştir. Günümüzde binlerce lncRNA keşfedilip önemli biyolojik sinyal yolları ile ilişkilendirilmiş olsa da hala bir çoğunun işlevi tümüyle aydınlatılamamıştır. Kanser gibi birçok hastalıkta bu moleküllerin ifadelerinin değiştiği belirlenmiştir. Hücrelerden salgılanan eksozomlarda da lncRNA’ların bulunduğu bilinmektedir ve eksozom içerikleri farklılık gösterebilir. Tez çalışmasında, hücre kültürü koşullarında anti-kanser ajanlar olan taksol ve bleomisin ile muamele edilen meme kanser hücre soylarında (MCF-7 ve MDA-MB-231) aday kodlanmayan RNA’ların (lincrna-p21 ve GAS5) gen ifade davranışları incelendi. Hücresel gen anlatım değişimlerinin, bu moleküllerin eksozomal ifadelerini nasıl etkilediği araştırıldı. Gen ifade düzeyleri nicel PZR yöntemi ile incelendi. Taksol ve bleomisin ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinde hücresel lincrna-p21 molekülünün ifade düzeylerindeki değişim istatistiksel olarak anlamlı bulundu (2.7 ve 2.8 kat artış, $p<0.05$). GAS5 molekülünün ifade düzeyindeki artış daha sınırlı idi (1.5 kat). Anti-kanser ajan uygulanan MCF-7 hücrelerinden salınan eksozomlarda yüksek oranda lincrna-p21 ve GAS5 birikimi gözlemlendi. Taksol muamelesi sonrasında eksozomal lincrna-p21 miktarı kontrole göre yaklaşık 2.5 kat artarken, bleomisin uygulamasında artış yaklaşık 5 kat idi. Eksozomal GAS5 miktarının ise 6 kat arttığı belirlendi. MDA-MB-231 hücrelerinde GAS5 ve lincrna-p21 ifade artış oranları istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu hücrelerinden salınan eksozomlarda lincrna-p21 seviyelerinde hücresel düzeylerin aksine, anlamlı artışlar saptandı. Taksol, eksozomal lincrna-p21 ifadesini 2.1-3.4 kat, bleomisin ise 2.5-3 kat yükseltmiştir. Bulgularımız, hücresel ve eksozomal lncRNA ifade profillerinin sitotoksik stres türüne, moleküllerin işlevine veya hücre tipine göre farklılık gösterebildiğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Meme Kanseri, Kodlamayan RNA’lar, lincrna-p21, GAS5, Eksozom

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 56669.

ABSTRACT

Koldemir, O. (2017). Investigation of cellular and exosomal expression of some candidate non-coding RNAs in MCF-7 breast cancer cells exposed to cytotoxic agents. Istanbul University, Institute of Health Sciences, Basic Oncology Department, M.Sc. thesis, Istanbul.

Long non-coding RNAs (long ncRNAs) are non-protein coding transcripts longer than 200 nucleotides. Recently, thousands of lncRNA were identified and associated with essential cellular pathways. Although the biological roles of the majority of these molecules remain to be clarified remarkable, some lncRNAs are downregulated or upregulated at numerous disease including cancer. Recent data reveals existence of lncRNAs in exosomes. Exosome are cell-derived vesicles that have characteristics of their own. Their compositions can be diagnosed about cell and microenvironment. In this thesis, two breast cell lines, namely MCF-7 and MDA-MB-231 were exposed to taxol and bleomycin in cell culture. Following exposure to cytotoxic agents, we analyzed expressions of candidate lncRNAs (lincrna-p21 and GAS5) in cells and released exosomes by RT-PCR. In MCF-7 cells treated with taxol lincrna-p21 expression is increased 2.7-fold. The rate was very similar (2.8-fold) in cells treated with bleomycin. Change in expression of GAS5 after treatment with anti-cancer agents was less (1.5 fold). We observed that exposure to anti-cancer agents led to a marked accumulation of lncRNAs in MCF-7-derived exosomes. We found that exosomal lincrna-p21 expression is increased at least 2.5-fold following taxol treatment while up to 5 fold at bleomycin. Extent of GAS5 accumulation in MCF-7-derived exosomes was more pronounced (approx. 6 fold). Although the effect of cytotoxic agents on lincrna-p21 and GAS5 in MDA-MB-231 cells was limited, exosomal enrichment of lincrna-p21 was remarkably (up to 3.4 fold). Taken together, our findings suggest that lncRNA profiles in cells and released exosomes may vary depending on their biological functions, cytotoxic stress and cell types.

Key Words: Breast Cancer, ncRNAs, lincrna-p21, GAS5, Exosome

This Project was supported by Istanbul University Scientific Projects Research Unit.

Project no: 56669

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri tüm dünyada kadınlarda en sık görülen malignitedir ve insidansı giderek artmaktadır [1]. Artan görülme sıklığına karşın, meme kanserine bağlı mortalite azalmaktadır. Bunun nedenleri arasında, mamografi taraması sonucu erken teşhis, cerrahi tekniklerdeki gelişmeler, radyoterapinin daha etkin hale gelmesi ve adjuvan tıbbi tedavilerdeki ilerlemeler sayılabilir [2]. Bu gelişmelere rağmen, meme kanseri, kadınlarda hala kanserden ölümlerde 2. sırada yer almaktadır.

Meme kanserinin evrelemesi diğer tümörlerde olduğu gibi tümör büyüklüğü, nod pozitifliği, ve uzak metastaz durumuna göre yapılır. Ancak klinik evreleme meme kanserinin prognoz ya da yönetiminde tek faktör değildir. Meme kanserinin erken saptanması, prognoz analizi ve tedavi etkinliğinin değerlendirilmesinde kullanılabilecek biyobelirteçler konusunda araştırmalar yapılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda önem kazanan molekül gruplarından biri de uzun kodlamayan RNA'lardır (long non-coding RNAs, lncRNA'lar). Bu moleküller protein kodlamayıp 200 nükleotid uzunluğunda veya daha uzun olabilmektedirler [3]. LncRNA'ların bir çoğunun işlevi bilinmemesine rağmen; gen ifade sürecinin birden fazla evrelerinde görev aldıkları gösterilmiştir [4-7].

Tez çalışmasında apoptozla ilişkili kodlamayan RNA'lardan lincrna-p21 ve GAS5 moleküllerinin ifade düzeyleri meme kanseri hücre soylarında ve bu hücrelerden kültür ortamına salınan eksozomlarda incelenecektir. GAS5'in apoptozu kontrol ettiği ve meme kanseri de dahil olmak üzere bir çok kanserde ifadesinin azaldığı gösterilmiştir [8-10]. Bu çalışmalar GAS5'in potansiyel bir tümör baskılayıcı molekül olduğunu göstermektedir. Tez çalışmasında incelenecek olan bir diğer molekül olan lincrna-p21, p53 proteinin hedef genlerinden biridir. p53 ve lincrna-p21 apoptoz ve hücre siklusunu durduran moleküllerdir [11]. lincrna-p21'in hücre proliferasyonu, DNA hasarı ve apoptoz, gelişimde ve hastalık progresyonunda düzenleyici görev üstlendiğini gösteren çalışmalar yapılmıştır [12,13]. Bu özellikler lincrna p21'in yeni bir biyo belirteç olabileceği potansiyeli taşıdığını gösteren çalışmalardan bazılarıdır.

Uzun kodlanmayan RNA'ların ifade düzeylerinin hücre bazda incelenmesinin yanı sıra eksozomlarda da incelenecektir. Eksozomlar idrar, tükürük, kan gibi bir çok biyolojik sıvıda bulunabilirler [14]. Eksozomların sahip oldukları moleküler içerikleri bulundukları fizyolojik koşullara ve salgılandıkları hücreye göre farklılık gösterir [15,16]. Ayrıca, eksozomların çeşitli sitotoksik ajanlar ve radyasyon gibi DNA hasarına ve apoptozu uyaran etmenler sonucu taşıdıkları lncRNA miktarlarında değişim olduğu gösterilmiştir [17]. lncRNA'ların ifadesinin eksozomal düzeyde incelenmesi, eksozomların hastalık teşhisi, tedavi sürecinin izlenmesi gibi klinik safhalarda kullanılabilmesi için geliştirilecek yöntemlere katkı sağlayabilir ve yeni çalışmalara da öncülük edebilir.

Tez çalışmasının reseptör pozitif invaziv meme kanserini temsil eden MCF-7 hücrelerinde yapılması planlanılmıştır. MDA-MB-231 adlandırılan ve üçlü-negatif meme kanseri özelliklerini taşıyan hücre soyu ise karşılaştırma için kullanılacaktır. Hücreler iki farklı mekanizmayla apoptozu uyaran sitotoksik ajanlar taksol ve bleomisin ile muamele edilecektir. Sitotoksik ajanların uygulanması sonrasında potansiyel tümör baskılayıcı olan lincrna-p21 ve GAS5 moleküllerinin hem hücrelerde hem de eksozomlarda ifade düzeyleri incelenerek, apoptotik süreçteki ve hücrelerin eksozomlar aracılığı ile etkileşiminde rolleri konusunda ipuçları elde edilebilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri

Meme dokusu hem kadınlarda, hem de erkeklerde bulunmasına karşın meme bezleri sadece doğumdan sonraki dönemde işlevsel olmakta ve süt salgılamaktadır. İnsanlarda meme dokusu meme bezlerinin yanı sıra bağ dokusu içerir loplardan ve kanallardan oluşur. Her meme, her birinde birçok lobül bulunan 15-20 lobtan oluşur. Lobüller, süt üreten çok sayıda küçük keseciklerle sonlanır. Loplar, lobüller ve kesecikler birbirine dok adı verilen kanallarla bağlıdır. Meme kanseri, meme dokusunu oluşturan tüm hücrelerden gelişebilirken, en sık bu kanalları oluşturan hücrelerden köken alır [18].

Hastalık erkeklerde nadiren görülür. Her iki cinsiyet göz önüne alındığında, bu hastalık, ölüm nedenleri arasında 5. sırada yer almaktadır. Artan görülme sıklığına karşın, meme kanserine bağlı mortalite azalmaktadır. Bunun nedenleri arasında, mamografi taraması sonucu erken teşhis, cerrahi tekniklerdeki gelişmeler, radyoterapinin daha etkin hale gelmesi ve adjuvan medikal tedavilerdeki ilerlemeler sayılabilir [2]. Bu gelişmelere rağmen, meme kanseri, kadınlarda hala kanserden ölümlerde 2. sırada yer yer almaktadır.

Meme kanseri, morfolojik, immünohistokimyasal, moleküler ve klinik olarak oldukça heterojen bir hastalıktır. Bu nedenle, hastalığın prognozu ve standart tedavilere cevabı hastadan hastaya farklılık göstermektedir. Meme kanserindeki yüksek heterojenliği standardize etmek amacıyla çeşitli sınıflama sistemleri geliştirilmiştir. Sınıflama şemaları son yıllarda giderek daha da gelişmiş prognoz ve tedavide kullanılmaya başlanmıştır. Meme kanseri kabaca, *in situ* karsinom ve invaziv kanser olarak kategorize edilebilir. *In situ* meme kanseri ise, büyüme özellikleri ve sitolojik özelliklere göre ayrıca duktal ve lobüler olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır. *In situ* duktal karsinom, lobüler olana göre daha sık gözlenir ve heterojen bir tümör grubunu içerir. Invaziv kanserler de, *in situ* karsinom gibi, histolojik alt gruplara farklılaşmış heterojen tümörleri içerir. Önemli invaziv tümör tipleri, infiltratif duktal, invaziv lobüler, duktal/lobüler, muzinöz, medullar ve papiller karsinomlardır. Bunlardan, infiltratif duktal karsinom, tüm invaziv meme kanserlerinin %70-80 kadarını oluşturur.

Son yıllarda, meme kanserinde moleküler sınıflamaların prognoz analizi ve tedavi etkinliğini değerlendirme açısından daha yararlı olabileceği gündeme gelmiştir [19]. Yapılan çalışmalarda, meme kanserinin çok sayıda moleküler alt tipi belirlenmiş ve bunlar çeşitli çalışmalarla teyit edilmiştir. Östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve ErbB/HER2 reseptör ekspresyon durumları göz önüne alınarak; bazal-benzeri (basal-like), Her2 aşırı eksprese eden normal meme benzeri (normal breast like), luminal A tipi (luminal subtype A) ve luminal B tipi (luminal subtype B) olmak üzere, en az 5 moleküler alt grup olarak sınıflandırılmıştır [20, 21]. Bu moleküler alt tipler, mikrodizin gen ifade çalışmaları ve hiyerarşik kümeleme çalışmaları ile belirlenmiştir. Çalışmalar, moleküler alt tiplerin, hastalıksız sağkalımı ve genel sağkalımı öngörme açısından önemli farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuştur. Örneğin, bazal benzeri veya üçlü-negatif grupta ($ER^-/PR^-/ErbB2^-$) yer alan hastalar en kısa genel sağkalıma sahiptirler [22].

Bütün bunlar, meme kanserinin tek bir hastalık değil, farklı moleküler özelliklere sahip tümörler olduğunu göstermektedir [23]. Bu farklı genetik yapıların doğal bir sonucu olarak bazı hastaların standart kabul edilen tedavilere daha az yanıt verdiği ve metastaz olasılıklarının arttığı ortaya konmuştur [24,25]. Günümüzde meme kanserinde yürütülen araştırmaların büyük bir çoğunluğu bu farklı biyolojik davranışların arkasında yer alan hücre içi temel moleküler mekanizmaların aydınlatılması ve bu mekanizmaları geri çevirmeye yönelik veya hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesi üzerinde odaklanmıştır [26, 27]. Diğer taraftan, meme kanserinin erken saptanması, prognozu ve tedavi etkinliğinin değerlendirilmesinde yeni biyobelirteç arayışları devam etmektedir. Bu amaçla, hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmalar yürütülmektedir.

2.1.1. Meme Kanseri Gelişiminin Moleküler ve Epigenetik Mekanizmaları

Meme kanseri bir çok açıdan heterojen bir hastalık olmasına karşın, genetik ve epigenetik araştırmaların hastalığın erken saptanması, teşhisi, tedavi etkinliğinin değerlendirilmesi ve prognoz analizi gibi konularda engellerin aşılmasına yardımcı olacağı öngörülmektedir. Yukarıda belirtildiği gibi, meme kanserinin alt tiplerinin tanımlanması için genetik çeşitlilikten yararlanılır. Bu alt tiplerin ortaya çıkmasına

neden olan moleküler ve epigenetik değişikliklerin neler olduğu ve prognoza etkileri günümüzde tam olarak çözülebilmüş değildir [20, 21].

Elde edilen bilgiler meme kanserinin moleküler alt gruplarında gen mutasyonları, kopya sayısı, ekzon dizileri, mikroRNA, protein, metillenme ve asetillenme seviyelerindeki değişimlerden meydana geldiğini göstermektedir. Stephen ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada, 100 meme tümöründe, protein kodlayan genlerin somatik kopya sayılarındaki değişimler ve mutasyonları incelemişlerdir. Buna göre 21,416 protein kodlayan gen bölgesi boyunca 7,421 somatik mutasyon belirlemişlerdir [28]. Bu çalışmada BRCA1, RB1, TP53, PTEN, AKT1, CDH1, GATA3, ve PIK3CA gibi bir çok genin meme kanseri gelişimine katıldığı ve somatik mutasyon taşıdıkları gösterilmiştir. Bu genler, apoptoz, hücre döngüsü düzenlenmesi, ve transkripsiyon kontrolü gibi farklı yollarda görev alırlar. Yapılan başka bir çalışmada ise, PPP2R2A, MTAP, ve MAP2K4 genlerinde kayıpların meydana geldiği saptanmış, genlerin yaklaşık %40'ında somatik kopya sayılarında değişim saptanmıştır [29].

Güncel veriler meme kanseri alt gruplarının yalnızca mutasyon sıklığıyla birbirinden ayrılmadığını aynı zamanda mutasyon tiplerinde de farklılıklar taşıdıklarını göstermektedir. Örneğin, luminal A ve B alt gruplarında TP53 mutasyonları çoğunlukla yanlış anlamlı iken, bazal tip meme kanserinde anlamsız ve çerçeve kayması mutasyonları yoğunluktadır. Aynı çalışmada PIK3CA, EGFR, FOXA1 ve HER2 genleri içeren bölgelerin kopya sayılarında artış gözlenirken, MLL2, PTEN, RB1, ve MAP2K4 gen bölgelerinde genomik kayıplar saptanmıştır [30].

Epigenetik değişimler çok sayıda kanserin gelişimi ve ilerlemesi için kritik bir faktördür. Bu değişimlere odaklanan çok sayıda güncel çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda, histon modifikasyonları, DNA metilasyonu ve miRNA ekspresyonu gibi epigenetik değişiklerin kanser gelişimine katkısı konusunda bilgiler artmaktadır. Örneğin yapılan bir çalışmada miR-12b, miR-145, miR-21, ve miR-155 gibi miRNA'ların meme kanserini de içeren çok sayıda kanser tipinde normale göre daha az ifade edildiği saptanmıştır [31]. Diğer bir çalışmada, düşük-orta derecede lizin asetillenmesi, lizin seviyesi ve arginin metillenmesinin kötü prognoz gösteren meme tümörleri ile (üçlü-negatif ve kanserlerde HER2+ gibi) ilişkili olduğu rapor edilmiştir

[32]. Metillenme derecesinin meme kanserinin agresifliğini etkilediğini gösteren çalışmalar mevcuttur [33]. Tüm bu çalışmalar, meme kanserinde moleküler sınıflandırmanın önemini vurgulamakta olup, bu alt tiplerin daha ileri düzeyde araştırılması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

2.2 Protein Kodlamayan RNA'lar

Yakın zamana kadar, kompleks organizmalarda gen ifade düzenlemesinin büyük oranda transkripsiyon faktörleri ve diğer düzenleyici proteinlerin birlikte çalışması ile gerçekleştiği düşünülmekteydi. ENCODE projesi gibi geniş çaplı genom çalışmaları, insan genomunun yapısı ve kromatin organizasyonu hakkında önemli bilgiler sağlamıştır [34]. Genomun “Atık DNA” denizinde protein kodlayan gen adalarından oluştuğu fikri yerine, giderek artan yeni bilgiler, genomun çok büyük bir kısmının düzenleyici görevler üstlendiğini göstermektedir [35]. ENCODE projesi, genomun sadece yaklaşık %1.2'sinin protein kodladığını, %20'sinin biyolojik fonksiyon ve %80'inden fazlasının ise biyokimyasal işlevsellik gösterdiği sonucuna ulaşmıştır. Protein kodlamayan DNA bölgeleri, yalnızca genomun üç boyutlu yapısını ve gen ifadesini düzenleme görevi görmeyip, DNA'ya bağlanan proteinlere substrat olmanın yanı sıra çok çeşitli kodlamayan RNA (ncRNA) molekülüne kalıp görevi görmektedir [36]. Bu moleküller hücreye özgü ve gelişimsel dinamik ekspresyon gösterirler [37, 38] ve büyük çapta düzenleyici görevler üstlenirler [39].

NcRNA'lar proteine dönüştürülmeyen RNA molekülleridir ve RNA polimerazlar tarafından üretilirler. Kodlamayan genler, proteine dönüşen mRNA'lar yerine, yapısal işlev gören, katalitik ya da düzenleyici görevler üstlenen RNA'ları kodlarlar [40]. NcRNA'lar işlevsel ve yapısal olarak farklı RNA tiplerini içerir. Bunlar arasında, protein sentezi ve RNA işlenmesinde görev alan, tRNA, rRNA, ribozimler, snRNA'lar, ve snoRNA'lar; piRNA'lar, kısa (20-25 nt) düzenleyici moleküller olan mikroRNA'lar (miRNA'lar) ve 200 nükleotitten daha uzun ve “Uzun Kodlamayan RNA'lar” olarak (lncRNA'lar) adlandırılan moleküller yer alır [3].

Yeni nesil dizileme yöntemlerinin gelişmesi ve uygulanabilirliğinin kolaylaşmasıyla yeni bulunan ncRNA'ların sayısı her geçen gün artmaktadır. Tüm keşfedilen ncRNA'ların işlevlerini açıklamak tam olarak mümkün olmasada hastalık

patolojisinde, özellikle de kanserle ilişkilerinin olup olmadığı araştırılmaktadır. Hücresel homeostaziye düzenlemekle görevli sinyal yollarının bozulması ile sonuçlanan genetik değişiklikler kanser gelişim mekanizmaları arasında ilk sırada yer alır [19].

Çok sayıda kanser somatik ve germline mutasyonlarının etkileşimi ve çevresel faktörlerin etkisiyle ortaya çıkar. Bu mutasyonların bir çoğu protein kodlama kapasitesinden yoksun bölgeler olan ve ncRNA'ları kodlayan bölgelerde meydana gelir [41]. Kanser biyolojisi ile ilgili yapılan çalışmalarda, lncRNA'lar en çok çalışılan molekül gruplarından birini oluşturur.

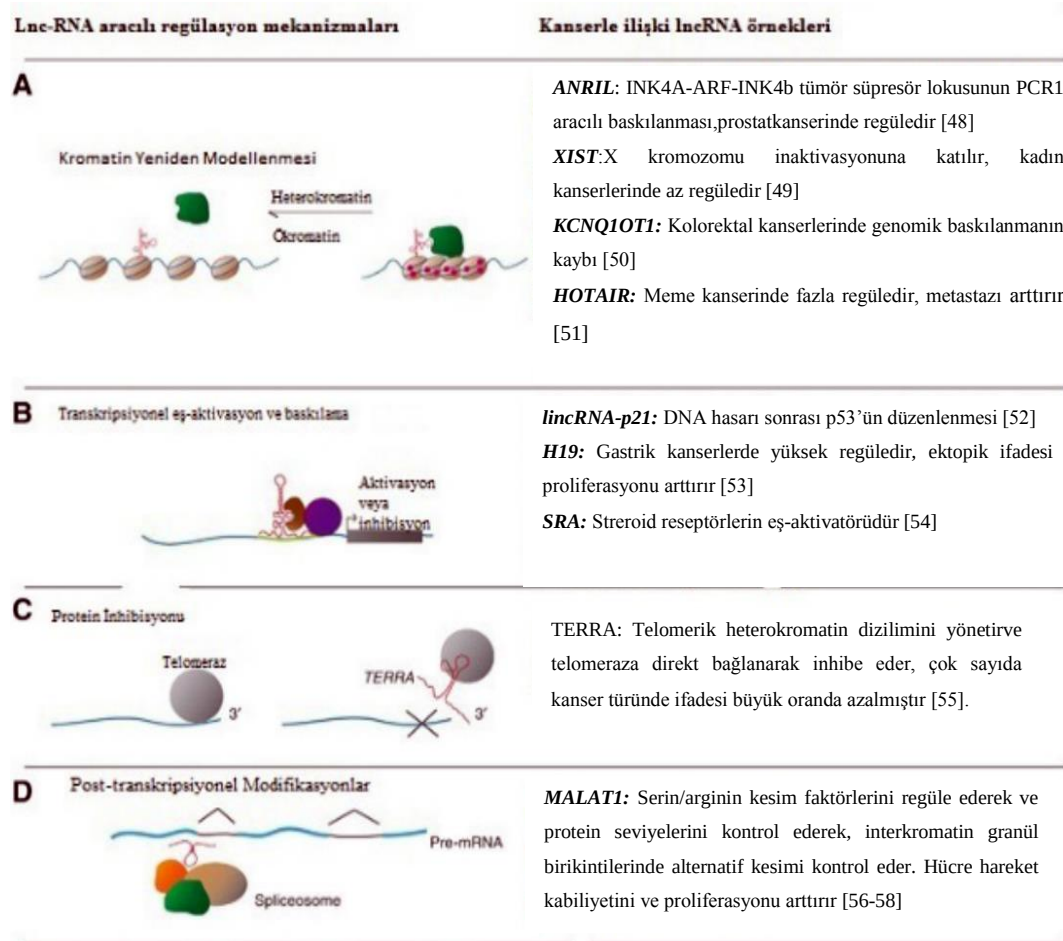
2.2.1 Uzun Kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar)

Uzunluğu 200 nt'den fazla olan ncRNA'lar uzun kodlanmayan RNA'lar (lncRNA) olarak adlandırılmıştır. lncRNA'lar, RNA polimeraz II tarafından transkribe edilmeleri, bazılarının poliadenilasyon içermeleri ve alternatif kırılmaya uğrama özellikleri bakımından mRNA'lar ile benzerlik taşırlar. Ancak, mRNA'ların aksine işlevsel proteinlere dönüştürülmezler. lncRNA'ları kodlayan DNA dizleri, protein kodlayan genlerin anlamlı ve anlamsız kısımlarında, intron bölgelerinde ya da genomun intergenik kısımlarında bulunabilirler [42]. Bu moleküller, hemen tüm insan dokularında ifade edilirken dokuya özgü ekspresyon gösterdikleri de bilinmektedir [43, 44].

Yeni nesil dizileme uygulamalarını içeren çalışmalar ile yüzlerce lncRNA keşfedilmiş ve bunların ifade düzeylerindeki değişimler farklı kanser tipleriyle ilişkilendirilmiştir. Az sayıda lncRNA'nın işlevselliği aydınlatılmış ve yine az sayıda lncRNA molekülünün malign dönüşüm ile ilişkisi bildirilmiştir. Ancak, bu moleküllerden bazılarının, hücre çoğalması, hücre sağkalımı, migrasyon veya genomik kararlılığı etkileyen ve böylece hücresel bütünlüğü sağlayan çeşitli sinyal yollarında anahtar role sahip oldukları gösterilmiştir [4-7].

lncRNA'lar, çeşitli mekanizmalarla gen ifadesini düzenleyen heterojen transkript gruplarıdır. Bazı moleküllerin, sağlıklı hücrelerin tümör hücrelerine dönüşmesine direkt olarak katıldıkları ve tümör dokularında farklı seviyelerde ifade

edildikleri gösterilmiştir. Örneğin, HOTAIR (‘HOX transcript antisense RNA’) olarak isimlendirilen molekülün yüksek ifade düzeyinin, gelişimsel evrede önemli olan HOXD gen kümesini susturarak meme kanseri hücrelerinin metastaz yeteneğini arttırdığı belirlenmiştir. Bir başka örnek olan ANRIL (CDKN2B) molekülünün yüksek ifadesi, prostat ve gastrik kanserin kötü prognozuyla ilişkilendirilmiştir. LncRNA'lar kanser hücrelerinin karakteristik özelliklerini etkileyen fonksiyonel transkriptlerdir ve her geçen gün daha fazla dikkat çeken potansiyel terapötik hedefler haline gelmektedirler [45-47]. Şekil 2.1’de kanser gelişimi ilişkilendirilmiş lncRNA molekülleri ve etkiledikleri yollara örnekler gösterilmektedir [40].



Şekil 2.1: Kanserle ilişkilendirilmiş bazı lncRNA moleküllerine ait sinyal yolları

2.2.2 GAS5

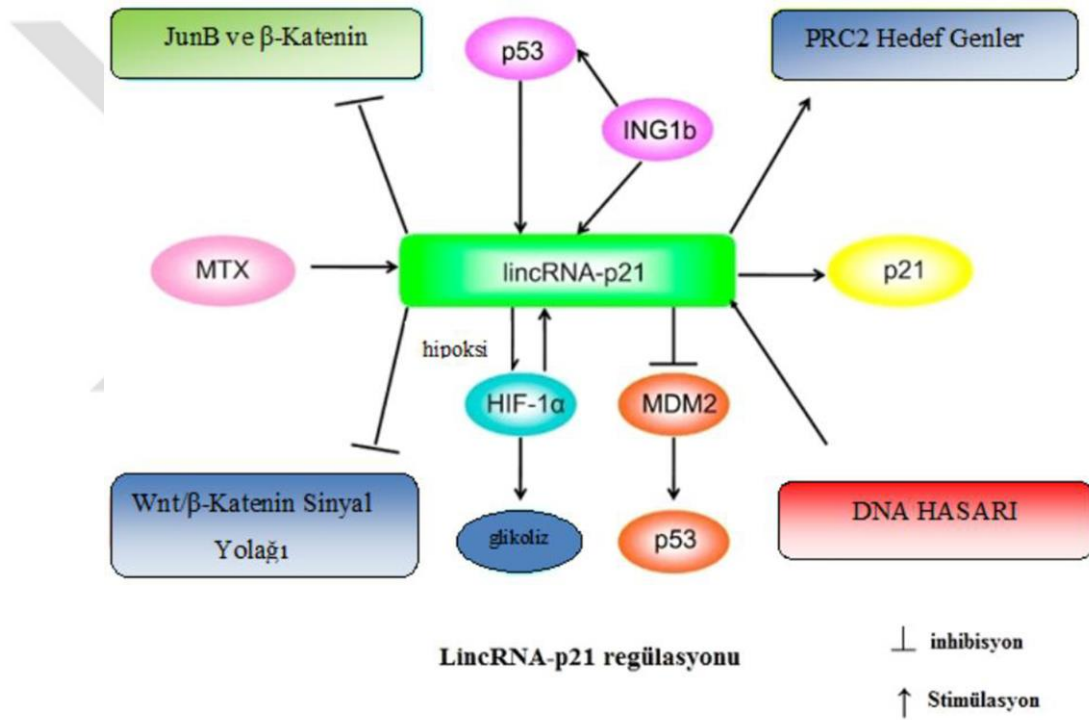
Tez çalışmasında konu edilen moleküllerden olan GAS5 ('Growth arrest-specific 5') 5' terminal oligo-pirimidin sınıfı gen ailesi üyesidir. GAS5 ilk olarak NIH3T3 hücrelerinden substrat hibritleme yöntemiyle izole edilmiştir [59]. GAS5'i kodlayan dizler, snoRNA'yı kodlayan gen bölgesinde içinde yer alır. Yapılan çalışmalar, GAS5'e ait okuma çerçevesinin küçük boyutlu olması ve molekülün evrimsel süreçte iyi korunamamasına karşın, alternatif kırılma ile farklı GAS5 transkriptleri ürettiğini göstermiştir [60, 61]. Bu sebeple GAS5'in önemli biyolojik faaliyetlerini çok sayıda snoRNA kodlayan intronları aracılığıyla gerçekleştirdiği düşünülmektedir [62].

Kodlanan RNA'nın ikincil yapısının bir kısmı glukokortikoid cevap elementini (GRE) taklit eder ve böylece glukokortikoid reseptörünün DNA'ya bağlanan domainine bağlanabilir [63]. Bu özelliğiyle GAS5, glukokortikoid reseptörünün aktifleşmesini engelleyerek glukokortikoid reseptörünün hedef genlerinin düzenlenmesini bozar. Ayrıca GAS5'in, GRE'yi taklit etmesiyle androjen, progesteron ve mineralokortikoid reseptörlerinin de transkripsiyonel düzenlenmesini kontrol ettiği düşünülmektedir [64].

Hücre büyümesinin durdurulması ('growth arrest') ve apoptoz gibi önemli hücresel olaylar GAS5 ile ilişkilendirilmiştir [6, 9]. GAS5 molekülüne ait bazı transkriptlerin büyümeyi durdurduğu ve meme kanseri hücre soylarında apoptozu uyardığı gözlenmiştir. Ayrıca, meme kanseri hücre soylarında ifadesinin değiştiği raporlanmıştır [5]. Molekülün bir çok tümör dokusunda ifadesinin azaldığı da bilinmektedir [8, 10]. Bütün bu özelliklerinden dolayı, GAS5'in potansiyel bir tümör baskılayıcı gen olduğu düşünülmektedir.

2.2.3 lincrna-p21

Tez çalışmasının diğer önemli bir parçası lincrna-p21 molekülüdür. lincrna-p21'i kodlayan bölge, hücre döngüsünün önemli bir düzenleyicisi olan *p21/CDKN1A*'nın yaklaşık 15 kb önünde konumlanır ve 3 kb uzunluğundadır. Bu nisbi olarak uzun bölgede farklı motifler yer alır. Bu motifler, hedef transkriptlerin ekspresyonunu ve düzenlenmesini kontrol eden miRNA'lar ve mRNA hedeflerine ek olarak RNA-bağlayan proteinlerle etkileşime girer [13].



Şekil 2.2: lincrna-p21'in düzenlenmesinde görev aldığı sinyal yolları

lincrna-p21, p21 protein seviyesini düzenlemede kilit rol oynar. lincrna-p21'in, p53 proteininin p21 promotör bölgesine yeterli derecede bağlanması için pivot görevi gören hnRNP-K'yı p21 promotör bölgesine çekerek, p21'in ifadesini arttırdığı bildirilmiştir [65]. lincrna-p21'in, hücre çoğalması, hücre ölümü ve DNA hasarına cevap yollarında yeni bir düzenleyici olarak görülmekte normal gelişim sırasında ve hastalıkların gelişiminde önemli rol oynadığı düşünülmektedir [66-68]. lincrna-p21'in hücre çoğalmasını ve apoptoz gibi bir çok sinyal yolağında görev alan molekülle

etkileşime girmesi, kanser ve bir çok hastalıkla ilgili yapılan çalışmalarda ilgi odağı olmasına neden olmuştur. lincrna-p21 molekülünün pek çok kanserde ifadesinin değiştiği saptanmış ve tümörojeniteyi etkilediği gösterilmiştir [13, 69, 70]. Şekil 2.2’de lincrna-p21’in ilişkili olduğu yolak ve moleküller gösterilmektedir [13].

2.3. Eksozomlar

Eksozomlar küçük, çift katmanlı lipid zarı olan endositik kökenli veziküllerdir, 50-100 nm yarı çapına sahiptirler ve elektron mikroskopunda dairesel morfoloji gösterirler. Bazı proteinleri (ör. CD63) yüksek miktarlarda taşırlar ve hücreler arası molekül taşınmasında görev alırlar [72].

Eksozomlar; mikroveziküller, eksozomlar ve zar partikülleri gibi diğer ekstrasellüler veziküllerin aksine, plazma zarından dökülerek veya tomurcuklanma ile oluşup hücre dışına salınmazlar [73]. Bunun yerine, eksozomlar, multiveziküler endozomlardan (MVE’ler) üretilir. Eksozom yapısı sitoplazmadaki protein, RNA’lar ve genomik DNA içeriğinin paketlenerek MVE içine alınması, MVE zarının içe çökmesi ve MVE içerisinde küçük, zarlı veziküllerin oluşmasıyla meydana gelir [73, 74]. Bunun devamında, MVE’ler plazma zarı ile birleşir ve zara bağlı içeriklerini (eksozomları) hücre dışına salırlar. Bütün MVE’ler eksozom salgılamaz ve lizozomlarla birleşerek degrade olabilirler [75].

Eksozomların zarında, endozom ile ilişkili transport ve füzyon proteinleri (flotilllin, anneksinler, GTPaz’lar), bazı lipidler (spingomiyelin, kolestorel, seramid) ve eğer antijen sunan hücrelerden salgılandıysa MHC-II bulunur. Eksozomlar, membranların yüzeylerinde bu moleküllere ek olarak endozoma özgü tetraspaninler (CD9, CD63, CD81, CD82) ve MVE senteziyle ilişkili proteinler (Alix, TGS 101) taşırlar [76-78]. Eksozomların sahip oldukları karakteristik zar belirteçlerinin yanı sıra, moleküler içerikleri bulundukları fizyolojik koşullara ve salgılandıkları hücreye göre farklılık gösterir [15] Eksozomların biyogenez mekanizması sonucunda ortaya çıkan vezikül; MVE zarının ve eksozomun salgılandığı hücrenin zarının içeriğini yansıtır [74, 79].

Eksozomların içeriği genomik DNA, mRNA, miRNA, lncRNA ve çeşitli proteinlerden oluşmaktadır [80]. Bu moleküllerin eksozom içine hangi mekanizma ile paketleniği tam olarak aydınlatılamamıştır. Çeşitli sinyal yollarının ve proteinlerin bu mekanizmada görev aldıkları gösterilmiştir. miRNA'ların paketlenmesi ve eksozomlara alınmasının seçici olarak gerçekleştiği gösterilmiştir [72, 74, 75]. Diğer moleküller için de seçici bir yüklemenin olup olmadığı henüz bilinmemektedir [75].

Eksozom paketlenmesine ek olarak, eksozom biyogenezinin her bir adımı (hücre zarına ulaşması, yanaşması, birleşmesi ve salgılanması) yüksek seviyede organizasyon ve düzenlenme içerdiğinden, bu basamakların kanser hücrelerinde değişime uğraması olası görülmektedir. Bu öngörü ile uyumlu olarak, kanser hücrelerinden, fizyolojik olarak çoğalan normal hücrelere göre daha fazla eksozom salındığı gösterilmiştir [81]. Bu bulguya açıklama olarak, kanser hücrelerinde yüksek çoğalma aktivitesi ve kemoterapik ajanların neden olduğu DNA hasarından kaynaklı stres koşulları gösterilmektedir. Bir çok kanser türünde, p53 aktivitesinin bozulması sonucu 'Tumor Suppressor-activated Pathway 6'nın (TSAP6) ifadesinin yükseldiği ve bunun sonucunda eksozom üretiminin arttığı saptanmıştır [82, 83].

Primer tümör kitlesi içindeki tümör hücreleri ve stromal hücrelerin, tümör büyümesi, invazyon ve progresyonda eksozomlar aracılığı ile iletişim halinde oldukları düşünülmektedir [81, 84]. Eksozomların çeşitli sitotoksik ajanlar ve radyasyon gibi DNA hasarında ve apoptozu uyaran etmenler sonucu taşıdıkları lncRNA miktarlarında değişim olduğu gösterilmiştir [79]. Sonuç olarak, eksozomlar hem taşıdıkları moleküller hem de yapıları ve fonksiyonları bakımından salgılandıkları hücreler ve tümör mikroçevreleri hakkında bilgi verebilmektedirler.

2.4. Sitotoksik Ajanlar ve Etki Mekanizmaları

Kanserin sitotoksik tedavisinde kullanılan çok sayıda antineoplastik ajan bulunmaktadır. Bu ajanlar etki mekanizmalarına göre, alkilleyici ajanlar, antimetabolitler, antimikrotübüller, antitümör antibiyotikler ve Topoziomeraz II inhibitörleri olarak sınıflandırılır. Sitotoksik ajanların bir kısmı, etki gösterebilmek için hücre döngüsüne bağımlı iken (ör. antimetabolitler, antimikrotübüller, Topoziomeraz II

inhibitörleri) bir kısmı da bundan bağımsızdır (alkilleyici ajanlar), antitümör antibiyotikler ise tüm fazlarda etkilidir [85]. Kanseri tipi, hastalığın evresi, hastanın durumu gibi pek çok etmen tedavide hangi ajanın kullanılacağını belirleyen konulardır [86]. Tez çalışmasında, meme kanseri hücrelerinde sitotoksikite ve apoptotik hücre ölümü oluşturmak amacıyla antimikrotübül (taksol) ve antitümör antibiyotik (bleomisin) ajanları kullanılmıştır.

2.4.1 Taksol

Taksol, 1962'de Amerika Ulusal Kanseri Enstitüsü tarafından desteklenen bir çalışmanın sonucu olarak pasifik porsuk ağacının kabuğundan elde edilmiştir. 1992 yılında ise meme kanseri tedavisinde kullanılması için Amerikan Gıda ve İlaç Ajansı (FDA) tarafından onaylanmıştır. Taksol, tübülünleri hedef alan birkaç ilaçtan biridir; tübülün dimerlerinin polimerizasyonunu artırır ve depolimerizasyonu engelleyerek mikrotübüllerin dağılmasını engeller [87]. Böylece kromozomlar metafaz fazında düzgün dağılamazlar. Bunun sonucu olarak mitozun ilerlemesi engellenir ve hücre döngüsünün mitotik kontrol noktası tarafından apoptoza yönlendirilir. Taksol, meme, yumurtalık, akciğer ve pankreas kanseri gibi çok sayıda kanserin tedavisinde kullanılmaktadır.

2.4.2 Bleomisin

Umezawa ve arkadaşları tarafından keşfedilen ve antineoplastik antibiyotik özelliği olan bleomisin, *Streptomyces verticillus*'den elde edilir. Bleomisin, glikopeptitten üretilen antibiyotik ailesidir. Bleomisinin, etkisini, DNA'da kırıklar oluşturarak gösterdiği düşünülmektedir. DNA zincir kesimlerini, O₂, metal iyonları ve Fe⁺⁺ iyonları varlığında en aktif şekilde gerçekleştirdiği gösterilmiştir [88, 89]. Metal iyonlarını şelatlayarak süperoksit ve serbest hidroksi radikalleri ile etkileşime giren psödoenzim üretilmesi sağlar. Bu etkileşim sonucu DNA kırıkları oluşur ve apoptoz uyarılır. Başka bir modele göre ise, bleomisin DNA'daki belli başlı bölgelerdeki bazlardan hidrojen atomlarını ayırır. Böylece diğer hücresel moleküllerin lipid oksidasyonu ve oksidasyonunu sağlayan kompleksler oluşur ve apoptoz uyarılır [90]. Bleomisin Hodgkin lenfoma, non-Hodgkin lenfoma, testis kanseri, yumurtalık kanseri, meme kanseri ve serviks kanseri gibi çok sayıda kanserin tedavisinde kullanılır [91].

Tez çalışmasında, hormon pozitif invaziv meme kanserini temsil eden MCF-7 hücreleri ile hormon ve Her2 negatif (üçlü-negatif) meme kanserini temsil eden MDA-MB-231 hücrelerinde, iki farklı mekanizma (taksol ve bleomisin) ile oluşturulmuş olan sitotoksikite ve apoptotik hücre ölümünde lincrna-p21 ve GAS5 moleküllerinin hücresel ifade düzeyleri ve eksozomlarda birikme kinetikleri incelenmiştir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Hücre Soyları

Çalışma, *in vitro* koşullarda yapılmış deneysel bir çalışma olup, deneyler İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Tez çalışmasında model hücre sistemleri olarak iki meme kanseri hücre soyu kullanıldı. Alman Biyolojik Materyaller Merkezi'nden (DSMZ# ACC115) temin edilen MCF-7 hücre soyu, luminal bir meme kanser hücre soyudur. Östrojen ve progesteron reseptörü ifade eden bu hücrelerde, Her2/Neu reseptör aşırı ekspresyonu yoktur (bazal tip). Kemoterapiye duyarlı olan bu hücreler kültürde kubbe şeklinde yapılar oluşturarak epitelial karakteristik gösterirler.

Kocaeli Üniversitesi'nden temin edilen MDA-MB-231 hücre soyu ise MCF-7 hücre soyunun aksine östrojen reseptörü, progesteron reseptörü ve Her2/Neu ifade etmediğinden üçlü negatif olarak adlandırılır. Bu hücreler oldukça agresif ve genelde kemoterapiye dirençlidir. Şekil olarak mezenşimal hücrelere benzer ve ayrıca, TP53, BRAF, CDN2A, KRAS ve NF2 gibi genlerde mutasyon taşırlar.

Tez çalışmasında, klinik olarak birbirinden farklı özelliklere sahip bu iki meme kanseri hücre soyunda, sitotoksik ajanların lincrna-p21 ve GAS5 hücrel ve eksozomal ifadelerine etkisinin araştırılmasında planlanmıştır.

3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

DMEM Besiyeri	[BIOCHROM]
Fetal Sığır Serum	[BIOCHROM]
Penisilin/Streptomisin	[BIOCHROM]
Tripsin/EDTA	[BIOCHROM]
Bleomisin	[APPLICHEM]
6X Yükleme Boyası	[FERMENTAS]
Taksol	[APPLICHEM]
100-bç Marker	[FERMENTAS]
0,5X TEB	[Laboratuar Stok]
PBS	[Laboratuar Stok]
RNA İzolasyon Kiti	[LIFE SCIENCES]
First Strand cDNA Sentez Kiti	[ROCHE]
Lightcycler DNA Master SYBR Green I	[ROCHE]
Lightcycler 480 Multiwell Plak	[ROCHE]

Primer	[IDT]
Cell Death Detection Elisa Kit	[ROCHE]
Eksozom İzolasyon Kiti	[LIFE SCIENCES]
Hücre Kazıma Çubuğu	[COSTAR]
Petri Kabı (60x15 mm)	[GREİNER BIO-ONE]
Kültür Kapları (25, 75 cm ²)	[TPP]
Total Eksozom RNA ve Protein İzolasyon Kiti	[THERMO]

3.1.3 Kullanılan Cihazlar

Sınıf II Laminar Akım Hücre Kültür Kabini	[TEZSAN]
CO ₂ İnkübatör	[HERAEUS]
Ters Mikroskop	[SEDIVAL]
Santrifüjler	[HETTICH, JOUAN]
-20 Derin Dondurucu	[ARISTON]
-80 Derin Dondurucu	[NUAIRE]
LightCycler 480	[ROCHE]
Jel Elektroforezi	[HORIZON]
Jel Görüntüleme	[VILBER LOURMAT]
Mikrodalga Fırın	[ARÇELİK]
Hassas Terazı	[CHYO]
Thoma Lamı	[HAUSSER]
ELISA Okuyucu	[RAYTO]
iCELLigence cihazı	[ACEA Biosciences]

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücrelerin Kültüre Alınması

Azot tankında çıkarılan hücrelerin oda sıcaklığında çözülmeleri sağlandı. Hücreler, %10 Fetal Bovin Serum (FBS) ve %1 streptomisin/penisilin (P/S) DMEM besiyeri içeren 14 ml'lik tüplere damlalar halinde yavaşça aktarıldılar. Hücre pelleti eldesi için 1500 rpm'de 5 dak. santrifüj edildi. Üst sıvı atılarak, hücre pelletleri 3 ml besiyeri içinde çözülerek pipetaj yapıldı ve hücreler iki ayrı 75 cm²'lik kültür şişelerine alındılar. İki kültür şişesine 10 ml DMEM besiyeri eklenerek 37° C'de %5'lik CO₂'li etüvde büyümeye bırakıldılar.

3.2.2. Hücrelerin Kültürde Büyütülmesi

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri için literatürde bildirilen ideal besiyeri, %10 FBS içeren DMEM besiyeridir (114). DMEM, vitaminler, amino asitler, tuzlar, glukoz ve pH indikatöründen oluşan bazal medyumdur. 1955 yılında Harry Eagle tarafından bulunan “Eagle’ın Basal Medyumu (BME)” nin değiştirilmiş halidir. DMEM, 4 kat daha yoğun vitamin ve amino asit içermektedir. Hücreler, fetal sığır serumu ve antibiyotik (%1) içeren DMEM ile 37 °C ısı ve %5’lik CO₂’li ortamda büyümeleri sağlandı.

Hücreler kültür şişesinin %75-85’ini kapladığında pasajlama işlemi uygulandı. Bunun için, her bir kültür şişesi içerisinde ölü hücreleri içeren atık besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı. Kültür şişelerine 3 ml Tripsin/EDTA (T/E) eklenerek, 5-10 dak. CO₂’li etüvde bırakıldı. Böylece, hücrelerin tutunduğu yüzeyden ayrılması sağlandı ve kültür şişelerine eşit hacimde besiyeri eklenerek T/E nötralize edildi. Hücreler 14 ml’lik tüplere alındı ve 3000 rpm’de 5 dak. santrifüj edilerek pelletler elde edildi. Hücre miktarına göre uygun hacim besiyeri içerisinde pelletler çözüldü. Hücre sayımının ardından hücre çözeltisinin yaklaşık olarak 1/5’i yeni kültür şişelerine aktarıldı ve aynı şartlarda büyümeye bırakıldı.

3.2.3. Hücre Sayımı

Toplam hücre süspansiyonunun mililitresindeki hücre sayısını hesaplamak için, üzerinde üçlü çizgilerle ayrılmış 16 büyük kareden oluşan yivler bulunan 1mm²’lik alan ve 0,1 mm derinliğe sahip Thoma lamaları kullanıldı. Süspansiyonun mililitresindeki toplam hücre sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Toplam Hücre Sayısı/ml} = \text{Sayım sonucu} \times 10^4 \times \text{Medyum miktarı (ml)}$$

3.2.4. Hücrelerin Sitotoksik Ajanlarla Muamele Edilmesi

Tez çalışmasında etki mekanizmalar farklı olan 2 sitotoksik ajan (taksol ve bleomisin) kullanıldı. Hücreler sitotoksik ajanlarla muamele amacıyla 60 mm petri

kaplarına ekildi. 24 saat sonra taksol (2 nM ve 10 nM) ve bleomisin (2 µg/ml ve 10 µg/ml) eklenmesini takiben, hücreler 24 saat boyunca adı geçen ajanlarla muamele edildiler.

3.2.5. Taksol ve Bleomisin-iliskili Sitotoksitenin Ölçümü

Taksol ve bleomisinin hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri gerçek-zamanlı (real-time) bir hücresel analiz ile belirlenmiştir. Analiz iCELLigence cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Bu sistemde, hücrelerin bulunduğu plaka yuvalarındaki mikroelektrodlar, elektriksel empedansı ölçmektedir. Hücre sayısındaki değişimler elektriksel empedansı etkileyerek, hücre çoğalmasının gerçek-zamanlı olarak değerlendirilmesi mümkün olmaktadır. Bu sayede, farklı ajanların hücre çoğalması üzerine etkileri nicel olarak belirlenebilmektedir. Muamele edilen hücrelerdeki hücre sayısı kontrol hücreleri ile karşılaştırılarak Hücre Endeksi (HI) hesaplanmaktadır. Bu değer, deney grubunda kontrol grubuna göre yüzdesel (%) değişimleri ifade etmektedir.

Analiz için yaklaşık 25.000 hücre ekildi. Taksol ve bleomisin eklenmesini takiben, hücreler 24 saat boyunca adı geçen ajanlarla muamele edildiler. Süre sonunda HI hesaplanarak adı geçen ajanların sitotoksik etkileri belirlendi.

3.2.6. Apoptotik Hücre Ölümünün Değerlendirilmesi

Sitotoksik ajanlarla muamele edilen hücrelerdeki apoptotik hücre oranları, ticari olarak temin edilen 'ELISA Cell Death Detection Kit' yardımı ile ölçülmüştür. Bu sistemde analiz, apoptotik hücre ölüm süresince, genomik DNA'nın nükleozomlar aracılığı ile kesilmesi sonucu ortaya çıkan ve sitoplazmaya salınan mono-ve oligonükleozomların sayısal olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Hücre ölümü sürecinde henüz hücre zarı parçalanmadan, DNA fragmanlarının sitoplazmada saptanması mümkün olduğundan, bu test, hücre kültüründe intakt hücrelerde (yüzeyden ayrılmamış) uygulanabilmektedir.

Kit, anti histon ve anti-DNA antikorları içermektedir. Ölçümün temel prensibi antijen-antikor ilişkisine dayanır. Anti-histon antikorları H1, H2A, H2B, H3, ve H4 histonları ile tepkimeye girerken, Anti-DNA antikorları tek ve çift iplikli DNA moleküllerine bağlanır. Elde edilen pozitif sinyal, hem DNA hem de histonların birlikte bulunduğunu gösterir ve sinyal kuvveti nükleozom ve dolayısıyla apoptoz miktarı ile doğrudan orantılıdır.

Ölçüm için hasat edilen hücrelerden elde edilen lizatlar kullanıldı ve ölçüm kit protokolüne göre yapıldı. Bu amaçla, -80°C 'ye kaldırılan hücreler alınıp üzerlerine 500 μl inkübasyon tamponu eklenerek homojenize edildi ve 30 dak. oda sıcaklığında muamele edildi. Yüksek hızda (20.000 g) 10 dak. santrifüj yapıldı ve santrifüj sonunda oluşan yaklaşık 400 μl üst sıvı faz yeni tüpe aktarıldı. ELİZA mikropiçinin her kuyucuğuna 100 μl kaplama solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Süre sonunda solüsyon ortamdan uzaklaştırıldı ve kuyucuklara 200 μl inkübasyon tamponu eklenerek 30 dak. oda sıcaklığında muamele edildi. Inkübasyon tamponu uzaklaştırıldı ve kuyucuklar yıkama solüsyonu ile 3 defa yıkandı. Hücrelerden elde edilen sitoplazmik lizatlardan 25'er μl , 200 μl inkübasyon tamponu ile karıştırıldı. Bu karışımdan 100'er μl kuyucuklara eklendi ve 90 dak. oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda 3 defa yıkama yapıldıktan sonra 100'er μl enzim solüsyonu eklendi. 90 dak. oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra tekrar 3 defa yıkama yapıldı. Daha sonra 100 μl sübstrat solüsyon eklenerek karıştırıcı üzerinde 250 rpm hızda renk değişimi görülünceye kadar muamele edildi (10-15 dak.). Renk değişimleri gözlendikten sonra absorbans değerleri ELİZA okuyucusunda 405 nm'de okutuldu ve değerler göreceli apoptoz miktarı olarak kabul edildi.

3.2.7. Kültür Besiyerinden Eksozom İzolasyonu

Eksozom izolasyonu için ticari olarak temin edilen eksozom izolasyon kiti kullanıldı. Sitotoksik ajan muamelesinin ardından toplanıp -20°C 'de saklanan sıvı besiyerleri oda sıcaklığında çözöldü. Hücre ve diğer atıkları uzaklaştırmak amacı ile, besiyeri 2000 g'de 30 dak. santrifüjlendi. Oluşan sıvı faz yeni deney tüpüne aktarıldı. 1 ml besiyeri için 500 μl Total Eksozom İzolasyon Ajanı eklenerek pipetaj yapıldı. $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bir gece inkübasyon işlemi gerçekleştirildi. Inkübasyonun ardından örnekler 1 saat süre ile 10,000 g'de ($+4^{\circ}\text{C}$) santrifüjlendi. Eksozomlar pellet halinde tüpün dibinde çöktüröldü ve sıvı faz ortamdan uzaklaştırıldı. Pellet, 100 μl PBS içinde çözöldü ve RNA izolasyonu için -20°C 'de muhafaza edildi.

3.2.8. Hücrelerden ve Eksozomlardan Total RNA İzolasyonu

lncRNA ekspresyon analizi için, hücre ve eksozomlardan total RNA izolasyonu yapıldı. Hücrelerden total RNA izolasyonu için ticari olarak temin edilen Trizol RNA solüsyonu, eksozomlardan total RNA izolasyonu için ise 'Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit' kullanıldı.

-80 °C 'de muhafaza edilen hücreler oda sıcaklığında çözüldü. Hücre pelletlerinin üzerine 1 ml Trizol solüsyonu eklendi ve pipetaj yapıldı. Oda sıcaklığından 5 dak. bekletildi. Hücre süspansiyonunun üzerine RNA'nın çözüldüğü bir faz oluşturmak için 200 µl kloroform eklendi. Oda sıcaklığında 2-3 dak. inkübe edilmesinin ardından +4° C'de 12,000 g'de 15 dak. santrifüjlendi. Santrifüj aşamasının ardından deney tüpünün içinde üç faz oluştu: alttan üstte doğru sırasıyla organik faz, interfaz, ve inorganik RNA fazı. RNA fazından, DNA'nın bulunduğu interfaza dokunulmadan 500 µl alınıp yeni tüpe aktarıldı. Üzerine RNA'nın çözünmediği bir süspansiyon oluşturmak için 500 µl izopropanol eklendi ve oda sıcaklığında 10 dak. beklendi. İnkübasyonun ardından 10 dak. süre ile +4° C sıcaklıkta 12,000 g'de santrifüjlendi. Sıvı fazın uzaklaştırılmasını takiben, oluşan RNA pelleti %75'lik soğuk etanol ile (1 ml) yıkanarak tekrar +4 °C'de 7500 g'de santrifüjlendi. Sıvı faz tekrar uzaklaştırıldı ve pellet kurumaya bırakıldı. Oda sıcaklığında kurutulmasının ardından, RNA pelleti RNaz içermeyen suda (30 µl) çözüldü ve -80 °C'de muhafaza edildi.

Eksozomlardan RNA izolasyonu için, hücre kültürü besiyerinden izole edilen eksozomlar -20 °C'den çıkarıldı ve kullanılan kitin protokolün göre işlem gerçekleştirildi. RNA izolasyonu kısaca şu şekilde gerçekleştirildi; eksozom pelletleri üzerine PBS eklendi ve pipetaj yapılarak çözülmeleri sağlandı. 10 dak. oda sıcaklığında inkübe edildi. RNA izolasyonda ilk adım olarak en son hacim 200 µl olacak şekilde PBS eklendi. Hazırlanmış olan 2X denatüre edici solüsyon 37 °C'ye ısıtılarak eşit hacimde (200 µl) eksozom süspansiyonuna eklendi ve 5 dakika buz üzerinde muamele edildi. Asit-fenol:kloroform karışımından eşit hacimde (400 µl) tüpe eklendi ve vortekslenerek karıştırıldı. Oda sıcaklığında yüksek hızda (10,000 g) sıvı faz ve organik faz oluşturmak için 5 dak santrifüj yapıldı. Sıvı faz dikkatli bir şekilde tüpten alınarak yeni tüpe aktarıldı.

RNA izolasyonunun ikinci aşaması RNA'nın saflaştırılmasıdır. Tüpe sıvı fazın 1.25 katı kadar %100'lük ethaol eklenip karıştırıldı. Her bir örnek için kolon filtreli tüpler toplama tüplerine yerleştirildi. Lizat ve ethaol karışımı filtreli tüpe aktarılıp 10,000 g'de sıvının filtreden geçmesi için yaklaşık 15 sn. santrifüjlendi. Filtreden geçen sıvı uzaklaştırıldı ve filtreye yıkama işlemleri uygulandı.

Filtre üzerine 700 µl miRNA yıkama solüsyonu 1 eklendi. miRNA'ların uzaklaştırılması için yaklaşık olarak 15 sn 10,000 g'de santrifüj yapıldı ve sıvının filtreden geçmesi sağlandı. İki kez yıkama işleminden sonra elüsyon aşamasına geçildi. Bu amaçla, kolon filtreler yeni toplama tüpüne aktarıldı. Daha önce 95 °C'ye ısıtılan elüsyon solüsyonu (50 µl) filtrenin üzerine dikkatlice pipetlendi ve RNA'nın filtreden tüpe geçmesi amacıyla 30 sn santrifüjlendi. İşlem tekrarlandı ve elde edilen RNA, konsentrasyon ölçümünden sonra, cDNA sentezine kadar -20° C'de muhafaza edildi.

3.2.9. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Kodlamayan RNA'ların ifade analizi için yukarıda anlatılan protokoller uygulanmasının ardından elde edilen total RNA'lardan cDNA sentezi gerçekleştirildi. Bunun içari ticari olarak temin edilen kit kullanıldı. cDNA sentezi için, 0,5 ml'lik PCR tüplerine 5 µl total RNA, 2 µl random hekzamer primeri ve 6 µl dH₂O eklendi. Daha sonra, Tablo 3.1 'de gösterilen reaksiyon bileşenleri sırasıyla karıştırılarak (toplam hacim 20 µl). termal döngü cihazına yerleştirildi. cDNA sentezinin reaksiyon koşulları Tablo 3.2'de gösterilmiştir. Elde edilen cDNA örnekleri nicel PCR yapılarına kadar -20° C'de muhafaza edildi.

Tablo 3.1 cDNA Reaksiyon Bileşenleri

Reaksiyon Bileşenleri	1 Örnek
5X RT Reaksiyon Tamponu	4 µl
Koruyucu Rnaz İnhibitör	0.5 µl
10 mM Deoksinükleotid	
Karışımı	2 µl
Transkriptör Reverse	
Transkriptaz	0.5 µl

Tablo 3.2 cDNA Reaksiyon Koşulları

Sıcaklık(°C)	Süre
25	5 dk
42	60 dk
70	5 dk

3.2.10. Nicel Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Sitotoksik ajanlara maruz kalmış MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerindeki uzun kodlamayan RNA moleküllerinin ifade düzeyleri nicel gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (GZ_PZR) ile analiz edildi. Analiz, laboratuvarımızda bulunan LightCycler 480 GZ-PZR cihazı ile gerçekleştirildi. İfade düzeyleri yarı-nicel ('semi quantitative') olarak belirlendi. *Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH)*, lncRNA'ların ifade miktarlarının normalizasyonu için referans gen olarak kullanıldı. SYBR Green boyası, nicel GZ-PZR'da floresans molekül olarak kullanıldı.

Tablo 3.3 GZ-PZR Reaksiyon Bileşenleri

Reaksiyon Bileşenleri	1 Örnek
10X lightCycler 480 DNA Master SYBR Green I	2 µl
Primer-F (300 uM)	0.2 µl
Primer-R (300 uM)	0.2 µl
MgCl ₂ (3mM)	1.6 µl
cDNA	3 µl
dH ₂ O	13 µl
Toplam	20 µl

Tablo 3.4 lncRNA molekülleri ve Referans Gene Ait Primer Dizileri

Gen Adı	İleri yönlü primer F (5' - 3')	Ters yönlü primer R (5' - 3')
lincrna-p21	GGGTGGCTCACTCTTCTGGC	TGGCCTTGCCCCGGGCTTGTC
GAS5	CTTCTGGGCTCAAGTGATCCT	TTGTGCCATGAGACTCCATCAG
GAPDH	GCTCTCTGCTCCTCCTGTTC	ACGACCAAATCCGTTGACTC

Tablo 3.3’de örnek başına gereken GZ-PZR bileşenleri gösterilmektedir. Tablo 3.4’de tez çalışmasında ifade düzeyleri incelenen uzun kodlamayan RNA molekülleri ve referans gen için kullanılan primer nükleotid dizileri gösterilmektedir. GZ-PZR koşulları, SYBR Green kitinin protokolüne göre belirlenmiştir. GZ-PZR protokolü 45 döngüden oluşur. 95 °C ‘de 10 dak’lık ön inkübasyon aşamasının ardından her bir döngü 95 °C’de 10 sn’lik, 60 °C’de 20 sn’lik ve 72°C’de 30 sn’lik olmak üzere sırasıyla denatürasyon, bağlanma ve sentez aşamalarını içerir.

GZ-PZR amplifikasyon adımının ardından, “Erime Eğrisi Analizi” (melting curve analysis) gerçekleştirilmiştir. Bunun amacı oluşan GZ-PZR ürünlerinin istenilen gerçek ürünler olup olmadığının teyit edilmesidir ve özgül olmayan ürünler primer dimerleri gibi ikincil yapıların çıkarılmasıdır. Bu da, GZ-PZR ürünlerinin erime sıcaklıkları (T_m) analiziyle yapılmaktadır. Bu amaçla, örnekler, 55 °C’den 95 °C’ye kadar saniyede 0.2 °C’de artan bir ısı yükselmesine tabi tutulurlar. Bu süreçte ortaya çıkan GZ-PZR ürünlerinin bileşenlerine göre yaklaşık 79-85°C aralığında erime eğrileri meydana gelmektedir.

Çalışmada incelenen lncRNA'ların hücresel ve eksozomal ifade düzeyleri göreceli olarak (yarı-nicel), $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metoduna göre yapıldı. GZ-PZR reaksiyonunda, floresan düzeyinin cihaz tarafından ölçülebilen eşik değeri aştığı döngü (cycle threshold) olarak isimlendirilir. Elde edilen C_t değerine göre $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu kullanılarak gen ifade düzeyleri saptandı. Bu amaçla kullanılan formül şu şekildedir:

$$\Delta\Delta C_t = (C_{thedef} - C_{referans})_{örnek} - (C_{thedef} - C_{referans})_{kontrol}$$

$$2^{-\Delta\Delta C_t} = 2^{-[(C_{thedef} - C_{referans})_{örnek} - (C_{thedef} - C_{referans})_{kontrol}]}$$

3.2.11 İstatiksel Analizler

GAS5 ve lincrna-p21 ifade düzeyleri üç bağımsız deneyin ortalaması alınarak hesaplandı. Taksol ve bleomisin ile muamele edilen hücrelerdeki parametre düzeyleri (apoptoz, hücresel ifade düzeyi, eksozomal ifade düzeyi) ile muamele edilmemiş kontrol grubunu oluşturan hücrelerdeki parametre düzeyleri 'bağımsız t-testi' ile karşılaştırıldı. $p < 0.05$ değerleri istatiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

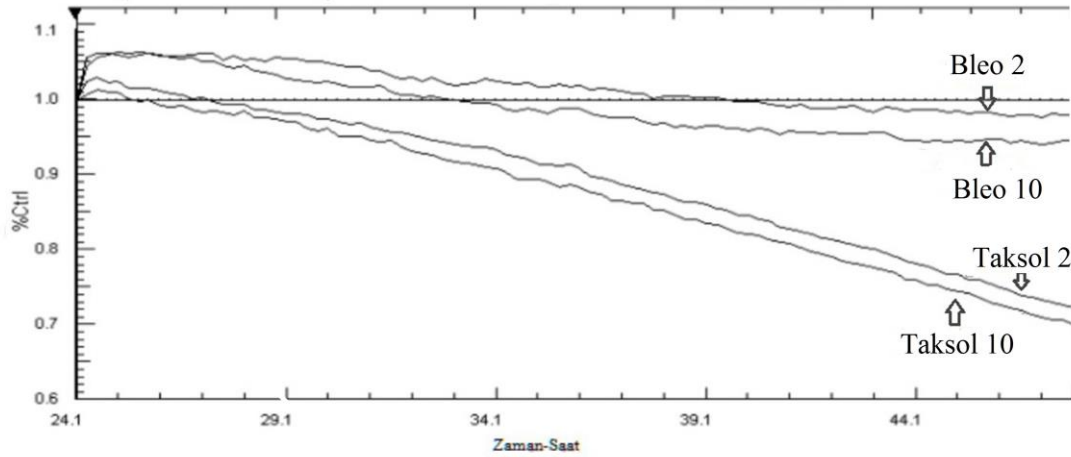
4.1. Hücrelerin Taksol ve Bleomisin ile Muamelesi

Yüksek lisans tez çalışmasında sitotoksik ajanlar uygulanan kanser hücrelerinde, kodlamayan RNA'ların (lncRNA) hücresel ve eksozomal bazda ifade düzeylerinin incelenmesi amaçlandı. Taksol ve bleomisin iki farklı mekanizmaya sahip, çeşitli kanserlerin tedavisinde kullanılan ilaçlardır. Yapılan ön deneyler sonucunda; bleomisin için 2 ve 10 µg/ml, taksol için ise 2 nM ve 10 nM dozları belirlenmiştir. Bu dozların çok yüksek oranda sitotoksik olmayan ancak hücresel gen ifade değişikliklerine yol açabilecek dozlar olacağı öngörülmüştür. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri belirtilen dozlarla 24 saat muamele edildi.

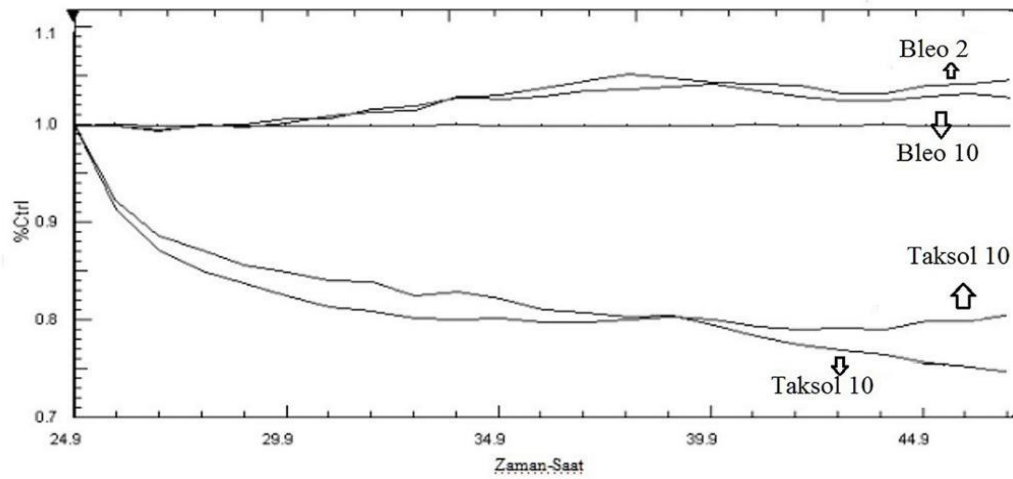
4.2. Anti-kanser Ajanların Yol Açtığı Hücresel Sitotoksitenin Değerlendirilmesi

Taksol ve bleomisin ile muamele edilen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde, bu ajanların hücre büyümesine olan etkileri gerçek-zamanlı hücresel analiz ile 'iCelligence' cihazı yardımıyla değerlendirildi. İlaç uygulanmayan hücreler kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Ajanların hücre çoğalmasına olan etkisi 'hücre endeksi' olarak ifade edilmiştir. Burada, kontrol hücrelerindeki hücre çoğalma endeksi '1' kabul edilerek sitotoksik ajanlarla muamele edilen hücrelerdeki çoğalma oranları ise kontrol hücrelerine göre oransal olarak ifade edilmektedir. Çalışmada birbirinden bağımsız 3 deney gerçekleştirilmiştir ve bunların ortalamaları alınarak istatistiksel karşılaştırmada kullanılmıştır.

Taksol ve bleomisin ile 24 saat muamele edilen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde yapılan gerçek-zamanlı hücresel analizlere örnekler Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de gösterilmektedir. Şekilde görüldüğü üzere, MCF-7 hücrelerinde bleomisine göre daha yüksek oranda taksol etkisi gözlenmiştir. Taksol, bu hücrelerde hücre çoğalma oranlarını yaklaşık %25-30 oranında azaltırken, doz bağımlı olarak oldukça sınırlı bir bleomisin etkisi gözlemlendi. MDA-MB-231 hücrelerinde de benzer bir tablo göze çarpmaktadır. Taksol hücre büyümesini doz bağımlı olarak %20-25 azaltırken, sınırlı bir bleomisin etkisi gözlemlendi.



Şekil 4.1: Sitotoksik ajan uygulanmış MCF-7 hücrelerinin hücre indeksi.



Şekil 4.2: Sitotoksik ajan uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinin hücre indeksi

Yapılan 3 deneyin ortalamasına göre hesaplanan ve ‘% değişim’ olarak ifade edilen değerler Tablo 4.1’te gösterilmektedir. Buna göre, taksolun her iki hücre soyunda uygulanan dozlarla doğru orantılı bir şekilde hücresel sitotoksiteyi arttırdığı gözlenirken, bleomisin etkinliği kullanılan dozlarda her iki hücre soyunda daha düşüktür.

Tablo 4.1 Sitotoksik ajan uygulanan hücrelerin göreceli hücre indeksi ve apoptoz

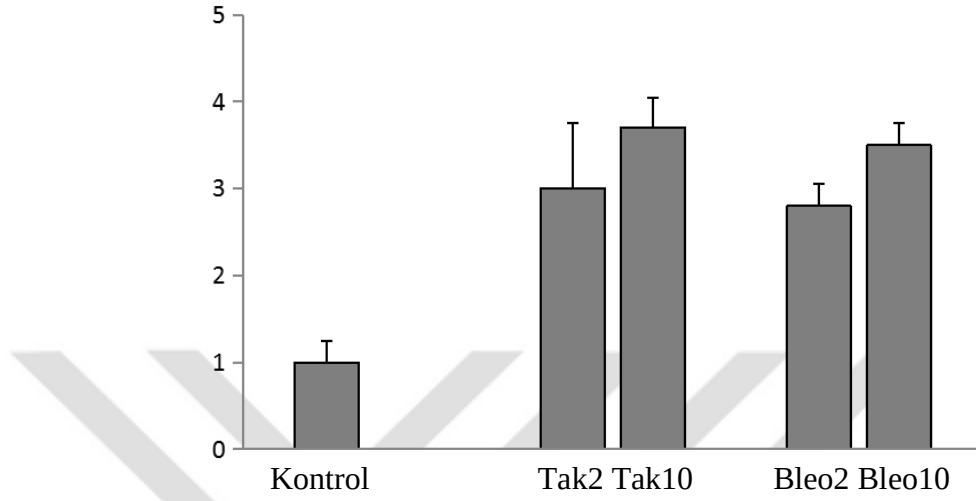
Hücre soyu	Ortalama hücre indeksi (% kontrol)				Apoptoz düzeyi (kontrolün kat değeri)			
	Tak2	Tak10	Bleo2	Bleo10	Tak2	Tak10	Bleo2	Bleo10
MCF-7	69	67	91	87	3	3.7	2.8	3.5
MDA-MB-231	80	75	98	97	1.8	2.1	1.5	1.9

4.3. Taksol ve Blomisinin Yol Açtığı Apoptotik Hücre Ölümünün Değerlendirilmesi

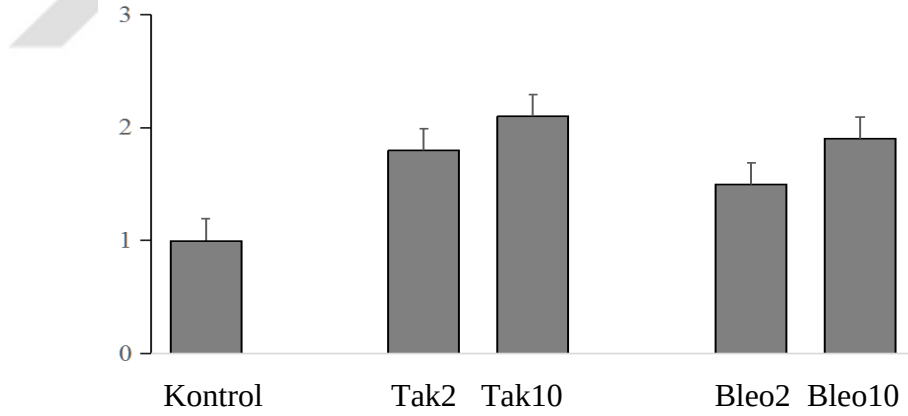
Bir sonraki aşamada taksol ve bleomisin ile muamele edilen meme kanseri hücrelerinde apoptotik hücre ölümü araştırıldı. Apoptoz düzeyi ELIZA-bazlı yaklaşımla ölçüldü. Detayları Gereç ve Yöntemler bölümünde anlatıldığı üzere, bu yaklaşımda apoptotik ölüm sürecinde bulunan hücrelerde, DNA'nın endonükleazlar tarafından kesilmesi sonrası ortaya çıkan ve sitoplazmaya salınan mono- ve oligonükleozmaların ölçümüne dayanmaktadır. ELIZA-tabanlı yöntemle miktarları göreceli olarak belirlenen nükleozomların düzeyi apoptoz oranı ile doğrudan korelasyon göstermektedir.

Taksol ve bleomisin uygulanan hücreler hasat edildi ve hücrelerden sitoplazmik lizatlar oluşturuldu. Elde edilen lizatlar nükleozomal yapıların ölçümünde kullanıldı. Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te sırasıyla MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine taksol ve bleomisinin uygulanan dozlarla ölçülen apoptoz düzeyleri gösterilmektedir. Burada, muamele edilen hücrelerdeki apoptoz düzeyi rölatifdir ve kontrol hücrelerine göre 'kat değişimi' olarak ifade edilmiştir. Tablo 4.1'de farklı deneylerin ortalama sonuçları gösterilmektedir. Taksolun her iki hücre soyunda daha toksik olması nedeniyle daha yüksek hücre ölüm oranları beklenmekteydi. Bununla uyumlu şekilde her iki hücre soyunda taksol ile daha yüksek hücre ölüm oranları elde edildi. Taksol uygulanan MCF-7 hücrelerinde, kontrol hücrelerine göre 3-3.7 kat daha fazla apoptoz gözlenirken ($p<0.05$), MDA-MB-231 hücrelerinde bu artış düşük doz için 1.8 kat ve yüksek doz için 2.1 kat olarak ortaya çıktı. Bleomisin daha az toksik gözükmesine karşın, bu ajanla muamele edilen hücrelerde de önemli derecede sitoplazmik nükleozomlar ölçülmüştür. Bleomisin, MCF-7 hücrelerinde düşük dozda 2.8 kat, yüksek dozda 3.5 kat ($p=0.036$)

hücre ölümüne yol açmıştır. Bu bulgular, bleomisin ile muamele edilen hücrelerin zar yapısı bozulmadan hemen önce, yani, henüz intakt durumda iken, apoptotik sürecin başladığı ve sitoplazmaya nükleozomların salındığını göstermektedir.



Şekil 4.3: MCF-7 hücrelerinde göreceli apoptoz düzeyi

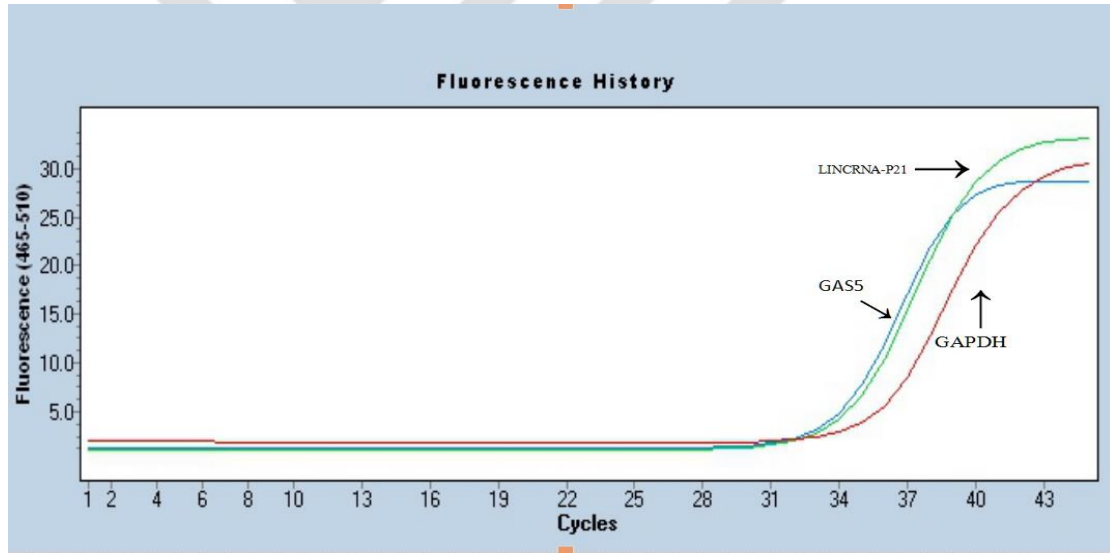


Şekil 4.4: MDA-MB-231 hücrelerinde göreceli apoptoz düzeyi

4.4. Anti-kanser Ajanlarla Muamele Edilen Meme Kanseri Hücrelerinde Gen İfade Analizi

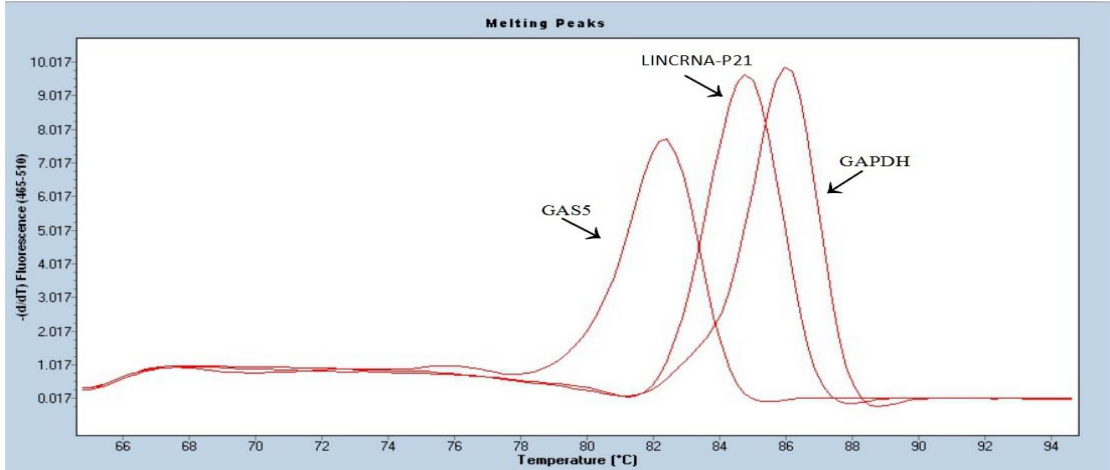
Tez çalışmasında, taksol ve bleomisin ile muamele edilen meme kanseri hücrelerinde hücre çoğalma ve ölüm düzeylerinin belirlenmesini takiben, saptanan etkilerin lincrna-p21 ve GAS5 moleküllerinin hücreSEL ve eksozomal ifade düzeylerini nasıl etkilediği araştırıldı.

Yukarıda tanımlandığı gibi, hücreler 24 saat boyunca taksol ve bleomisine maruz bırakıldı. Hasat edilen hücrelerden total RNA izole edildi. RNA'ların cDNA dönüştürülmesinin ardından lncRNA moleküllerinin ifadeleri GZ-PZR yöntemiyle analiz edildi. Şekil 4.5'de aynı örnekten çoğaltılan GAS5, lincrna-p21 ve referans genin (GAPDH) çoğalma eğrileri gösterilmektedir.



Şekil 4.5: GAS5, lincrna-p21 ve GAPDH'a ait çoğalma eğrileri

Nicel PZR'da özgül olmayan ("non-specific") ürünlerin çoğalmadığından emin olmak için, reaksiyon sonunda "erime eğrisi analizi" gerçekleştirildi. Şekil 4.6'da görüldüğü üzere hedef genler dışında istenmeyen ürünlerin çoğalmadığı görülmektedir.



Şekil 4.6: GAS5, lincrna-p21 ve GAPDH eğrime eğrileri

Meme kanseri hücrelerinde ve bu hücrelerden salınan eksozomlarda hedef lncRNA moleküllerinin ifade düzeyini hesaplamak için en az 2 deney gerçekleştirilerek bunların ortalamaları alındı.

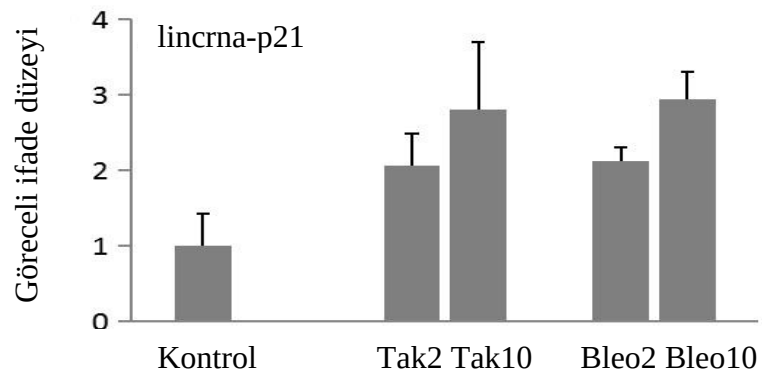
4.5. Anti-kanser Ajanlarla Muamele Edilen MCF-7 Hücrelerinde lincrna-p21 ve GAS5 İfade Düzeyi

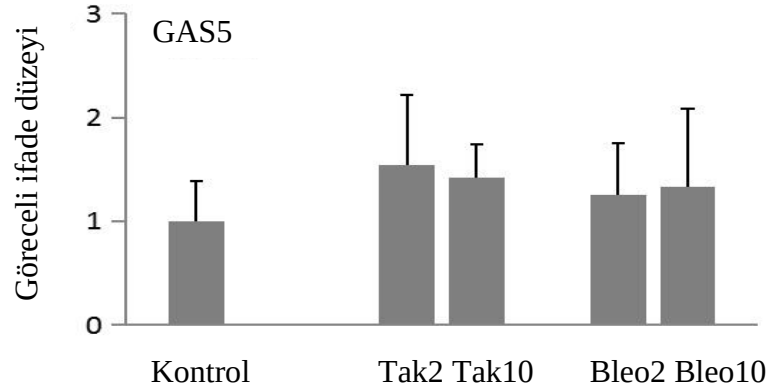
Taksol ve bleomisin ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinde lincrna-p21 ve GAS5 ifade düzeylerini belirlemek amacıyla 3 farklı deney gerçekleştirildi. Bu deneylerde elde edilen göreceli ifade düzeyleri Tablo 4.2’de gösterilmektedir. Bu verilerden yola çıkarak, kontrol hücrelerindeki ortalama ifade düzeyi ‘1’ kabul edilerek, deney gruplarındaki ifade düzeyleri ‘kat değişimi’ olarak hesaplandı. Kat değişimleri olarak ifade edilen lincrna-p21 ve GAS5 ekspresyon seviyeleri sırasıyla Şekil 4.7 ve 4.8’de gösterilmektedir.

Şekillerde görüleceği üzere, taksol uygulanan hücrelerde lincrna-p21 molekülünün ifade düzeyi en yüksek dozda yaklaşık olarak 2.7 kat artarken, bleomisin ile muamele edilen hücrelerde ise bu oran 2.8 kat olarak belirlendi. lincrna-p21 değişim oranları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$),

Tablo 4.2 MCF-7 hücrelerinde göreceli lincrna-p21 ve GAS ifade düzeyleri

	lincrna-p21	GAS5
Kontrol	0,024	0,17
	0,01	0,3
	0,013	0,27
Taksol 2	0,029	0,27
	0,025	0,5
	0,039	0,35
Taksol 10	0,031	0,29
	0,036	0,4
	0,06	0,35
Bleomisin 2	0,035	0,25
	0,029	0,4
	0,033	0,25
Bleomisin 10	0,043	0,33
	0,039	0,45
	0,051	0,19

**Şekil 4.7: MCF-7 hücrelerinde lincrna-p21 ifade düzeyleri**



Şekil 4.8: MCF-7 hücrelerinde GAS5 ifade düzeyleri

Sitotoksik ajanların MCF-7 hücrelerinde GAS5 molekülünün ifadesini nispeten daha az arttırdığı görülmektedir. Taksol ile muamele edilen hücrelerde GAS5 molekülünün ifade düzeyi yaklaşık 1.5 kat artarken ($p \approx 0.08$), bleomisin uygulanan hücrelerde artış oranı daha düşük idi (1.4 kat).

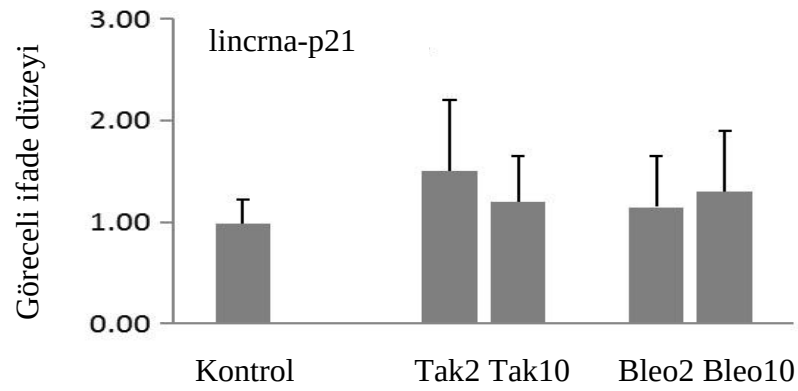
4.6. MDA-MB-231 Hücrelerinde lincrna ve GAS5 Moleküllerinin İfadesinin İncelenmesi

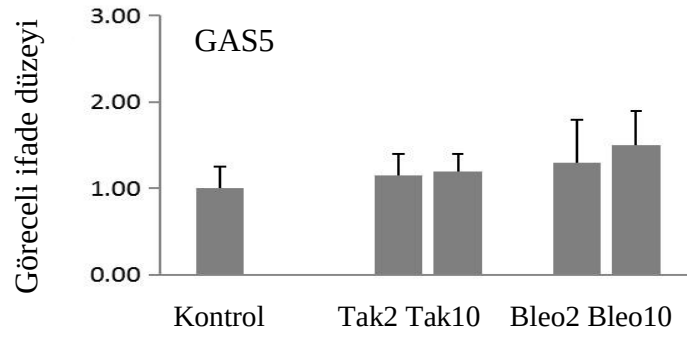
Tez çalışmasında, MDA-MB-231 hücrelerinin anti-kanser ajanlarla muamelesi ve lincrna-p21 ile GAS5 molekülünün ifade düzeylerinin incelenmesi MCF-7 hücrelerinde yapıldığı gibi gerçekleştirildi. Tablo 4.3’de bu hücrelerde gözlenen göreceli ifade düzeyleri yer almaktadır. Şekil 4.9 ve 4.10’da ise, lncRNA molekülünün ifade değişimlerinin kat değişimi olarak gösterimi yer almaktadır.

MDA-MB-231 hücrelerinin apoptoz ve sitotoksosite ölçümlerinde gözlemlendiği üzere anti-kanser ilaçlarına MCF-7 hücrelerinden daha dirençli olduğu, RNA molekülünün ifadesine yansımıştır. Şekillerde görülebileceği gibi, her iki molekülün ifade düzeylerinin, anti-kanser ajanlarla muamele sonrası sınırlı oranda arttığı gözlemlendi. Artış oranları en fazla 1.5 kat olarak gerçekleşti. Elde edilen farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Tablo 4.3 MDA-MB-231 hücrelerinde lincrna-p21 ve GAS ifade düzeyi

	lincrna-p21	GAS5
Kontrol	0,000512	0,12
	0,000145	0,07
Taksol 2	0,000745	0,09
	0,000247	0,14
Taksol 10	0,00047	0,14
	0,000321	0,1
Bleomisin 2	0,000547	0,18
	0,000214	0,08
Bleomisin 10	0,000345	0,19
	0,000482	0,11

**Şekil 4.9: MDA-MB-231 hücrelerinde lincrna-p21 düzeyleri**



Şekil 4.10: MDA-MB-231 hücrelerinde GAS5 düzeyleri

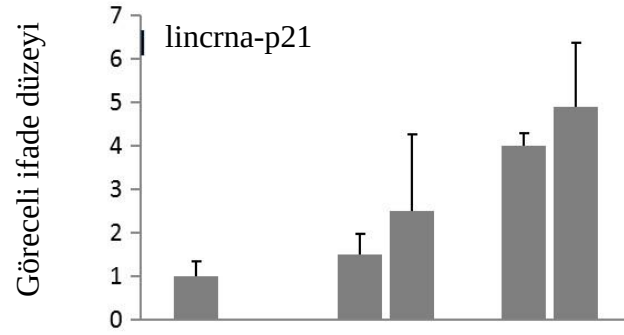
4.7. MCF-7 Hücrelerinden Salınan Eksozomlarda lincrna-p21 ve GAS5 Moleküllerinin Miktar Tayini

Anti-kanser ajanlara maruz bırakılan hücrelerde kodlamayan RNA moleküllerinin ifade düzeylerinin belirlenmesini takiben, tez çalışmasında öngörüldüğü üzere, hücrelerden dış ortama (kültür besiyerine) salınan eksozomlarda lincrna-p21 ve GAS5 moleküllerinin miktarları araştırıldı. Standard hücre kültürü koşullarında 24 saat sitotoksik ajan uygulanan hücrelerin bulunduğu hücre kültürü ortamından sıvı besiyeri toplandı. Eksozom izolasyonunu takiben, eksozomal RNA molekülleri özel kit yardımı ile izole edildi. cDNA sentezi sonrası hedef lncRNA moleküllerinin eksozomal miktarları nicel PZR’de belirlendi. En az 3 bağımsız deneyin ortalaması alındı. Tablo 4.4’de MCF-7 hücrelerinde elde edilen göreceli miktarlar yer almaktadır. Kontrol hücrelerine göre kat değişimi olarak ifade edilen sonuçlar Şekil 4.11 ve Şekil 4.12’de gösterilmektedir.

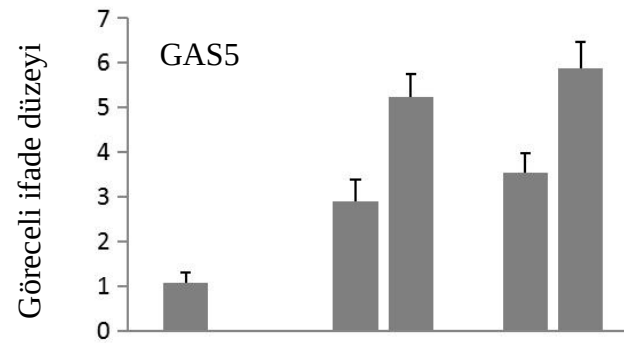
Tablo 4.4 MCF-7 hücrelerinden salınan eksozomlarda lincrna-p21 ve GAS5 ifadesi

	lincrna-p21	GAS5
Kontrol	0,15	1,5
	0,51	1
	0,2	0,7
Taxol 2	0,43	2
	0,35	3,1
	0,51	3,6
Taxol 10	0,16	4,2
	1,3	5,9
	0,7	5,6
Bleomisin 2	1,2	3,5
	1,15	2,8
	1,1	4,3
Bleomisin 10	1,4	4,9
	1,2	5,7
	1,7	7

MCF-7 meme kanseri hücrelerinin taksol ve bleomisin ile muamelesi sonucu, hücrelerden salınan eksozomlarda yüksek oranda lincrna-p21 ve GAS5 birikimi görülmektedir. lincrna-p21 miktarında artışın bleomisine maruz bırakılan hücrelerde daha yüksek olduğu göze çarpmaktadır. Yüksek doz (10 nM) taksol, eksozomal lincrna-p21'i miktarını yaklaşık 2.5 kat artırırken ($p<0.01$), artış oranı bleomisin ile 4.9 kata kadar çıkmaktadır ($p=0.003$). Bu etki GAS5 molekülünün göreceli ifade düzeyine, taksol ve bleomisinin uygulanması sonrası benzer etki ettiği gözlemlendi. Şekil 4.12'de görülebileceği gibi, doz bağımlı olarak eksozomal GAS5 düzeyinin kontrole göre 6 kata kadar arttığı görülmektedir ($p<0.001$).



Şekil 4.11: MCF-7 eksozomlarında lincrna-p21 ifade düzeyleri



Şekil 4.12: MCF-7 eksozomlarında GAS5 ifade düzeyleri

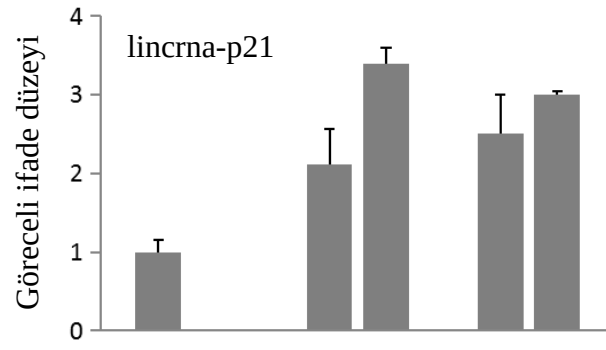
4.8. MDA-MB-231 Hücrelerinden Salınan Eksozomlarında lincrna-p21 ve GAS5 Moleküllerinin İfadesinin İncelenmesi

Sitotoksik ajanlarla muamele MDA-MB-231 hücrelerinde, lincrna-p21 ve GAS5 moleküllerinin hücresel anlatım düzeylerinin MCF-7 hücrelerine göre daha arttığının saptanmasını takiben, bu hücrelerden salınan eksozomlarda hedef RNA molekülleri incelendi. Moleküllerin eksozomlardaki nicel PZR ile elde edilen göreceli miktarları Tablo 4.5’de yer almaktadır. Taksol ve bleomisin ile muamele edilen hücrelerden salınan eksozomlarda, kontrole göre kat değişim oranları ise Şekil 4.13 ve 4.14’te görülebilmektedir.

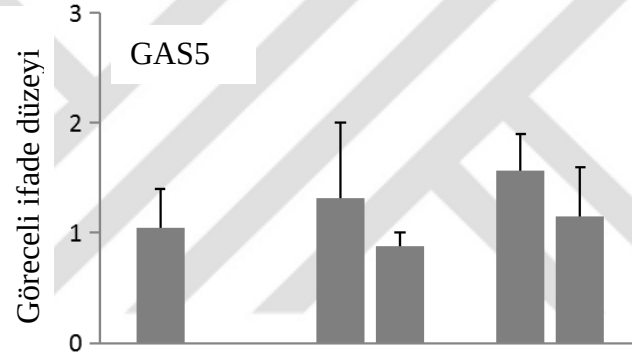
Tablo 4.5 MDA-MB-231 hücrelerinden salınan eksozomlarda lincrna-p21 ve GAS5 ifadesi

	lincrna-p21	GAS5
Kontrol	0,11 0,14	1,4 0,7
Taksol 2	0,22 0,31	0,63 2
Taksol 10	0,45 0,41	0,76 1
Bleomisin 2	0,27 0,37	1,23 1,9
Bleomisin 10	0,37 0,38	0,71 1,6

Taksol ve bleomisin ajanları uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinden salınan eksozomlarda lincrna-p21 seviyelerinde hücresel düzeylerin aksine, anlamlı artışlar saptandı. Taksol muamelesi, eksozomal lincrna-p21 seviyelerinde 2.1-3.4 kat ($p<0.05$) artışa yol açarken, bleomisin uygulandığı durumda artış oranları 2.5-3 kat olarak gerçekleşti ($p=0.02$). GAS5 molekülünün ifade düzeylerine bakıldığında ise, düşük doz taksol (2nM) uygulanan hücrelerden salınan eksozomlarında kontrole göre 1.3 kat uyarım gözlenirken, yüksek doz uygulanan durumda ise eksozomlarda GAS5 molekül düzeyinin bir miktar azaldığı göze çarpmaktadır. Bleomisin uygulanan hücrelerden salınan eksozomlarda GAS5 ifade düzeyleri incelendiğinde ise taksolda olduğu gibi, düşük dozda daha yüksek (1.5 kat) artış gözlemlenmiştir ($p>0.05$).



Şekil 4.13: MDA-MB-231 eksozomlarında lincrna-p21 ifade düzeyleri



Şekil 4.14: MDA-MB-231 eksozomlarında GAS5 ifade düzeyleri

5. TARTIŞMA

Uzun kodlanmayan RNA'lar (lncRNA'lar), hücre bölünmesi, sağkalım, hücre ölümü ve farklılaşma gibi hücrelerin akıbetini belirleyen biyolojik olaylarda rol oynayan işlevsel moleküllerdir. Bazı lncRNA moleküllerinin işlevleri ve etki mekanizmaları detaylı olarak açıklanmıştır [4-7]. Ayrıca, bu moleküllerin bir çoğunun çeşitli kanserlerde ifadelerinin değiştiği belirlenmiştir [7, 9, 11, 12, 15]. Anlatım düzeylerinin değişimi, protein kodlayan genlerde olduğu gibi artış veya azalma şeklinde olmaktadır. Tümör dokularında gerçekleştirilen gen ifade çalışmaları ve hücre soylarında yapılan işlevsel çalışmalar, bu moleküllerin bazılarının onkolojik araştırma ve uygulamaların çeşitli aşamalarında biyobelirteç olarak kullanılma potansiyellerini ortaya çıkarmıştır. Bunun ilginç bir örneği, lncRNA'ların, çeşitli mRNA molekülleri ve mikroRNA'larla birlikte hücrelerden salınan veziküllerde (eksozomlar gibi) saptanabiliyor olmalarıdır [72, 80, 83]. Kürsümüzde yapılan çalışmalarda, kültür hücrelerinden salınan eksozomlarda test edilen lncRNA moleküllerinden bazılarının hücresel düzeylerine göre eksozomlarda miktar açısından zenginleştirildikleri saptanmıştır [79]. Bu ve benzeri bulgular, RNA moleküllerinin seçici (selektif) olarak eksozomlara yüklendiğine ve bulundukları mikroçevrede hücresel olayları etkileyebildiklerine işaret etmektedir.

DNA hasarı, büyüme faktör eksikliği, sitotoksosite ve onkogen ifadesi gibi hücresel stresler, apoptotik sinyal yollarını etkileyen moleküllerin ifadesini değiştirmekte ve hücre ölümüne yol açmaktadır [4, 17, 68, 92]. Tez çalışmasında, meme kanseri hücreleri model sistem olarak kullanılarak, anti-kanser ajanlara maruz bırakılan hücrelerde apoptozla ilişkili iki lncRNA molekülünün (lincrna-p21 ve GAS5) hücresel ve eksozomal ifade profillerinin nasıl değiştiğinin araştırılması amaçlanmıştır. Literatürde bu şekilde yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmada kullanılan 2 hücre soyundan ilki olan MCF-7 hücreleri hormon reseptör pozitif (PR+, ER+, HER2-) invaziv meme kanserini temsil ederken, MDA-MB-231 hücreleri üçlü-negatif (ER-, PR-, HER2-) olarak adlandırılan ve daha agresif olan meme kanseri özellikleri göstermektedir. Çalışmada, sitotoksosite oluşturmak amacıyla, meme kanseri ve diğer bazı kanserlerde anti-kanser ajan olarak kullanılan taksol ile yine çeşitli kanserlerde kullanılan bleomisin den yararlanılmıştır. Taksol mikrotübül depolimerizasyonunu

engelleyerek mitotik evrede hücre bölünmesini durduran anti-kanser ajanlardan biridir [85]. Bleomisin ise serbest radikaller oluşturarak DNA moleküllerinde kırılmalar oluşturur [88].

Çalışmada, lincRNA-p21 ve GAS5 moleküllerinin anlatım düzeyleri incelenmeden önce, farklı sitotoksikite mekanizmalarına sahip taksol ve bleomisin uygulanan meme kanseri hücrelerinde ortaya çıkan toksisitenin boyutu ve apoptotik hücre ölüm düzeyleri incelendi. Yukarıda ifade edildiği gibi, çok yüksek düzeyde toksisite oluşturmadan lncRNA'ların ifadelerinin nasıl değiştiğini araştırmak amacıyla anti-kanser ajanlar düşük dozlarda kullanıldı. İlaçların hücre çoğalması üzerine etkileri gerçek-zamanlı hücresel analiz ile incelendi. Seçilen dozlarda, taksolun her iki hücre tipinde de bleomisine göre daha fazla oranda anti-proliferatif etki gösterdiği saptandı. Gözlenen bu etki MCF-7 hücrelerinde daha yüksek idi. Bu bulgu, her iki hücre hattında taksol ile yapılan bir çalışmanın bulguları ile uyumlu gerçekleşmiştir [93]. Yani reseptör pozitif özellikte olan MCF-7 hücrelerinde, üçlü-negatif meme kanseri fenotipindeki hücrelere göre daha etkin bir anti-proliferatif etki elde edilmektedir. Bu bulgu, meme kanserli hastalarda elde edilen klinik bulgularla da uyumludur [93, 94].

Gerçek-zamanlı hücresel analiz daha yakından incelendiğinde, her iki anti-neoplastik ajanın, hücre çoğalma kinetiğini etkileme şeklinin iki meme kanseri soyunda farklı olduğu göze çarpmaktadır. Taksol ve bleomisinin MCF-7 hücrelerindeki etkileri, uygulanmanın başlamasını takip eden 10. saatin ardından hız kazanırken, taksol MDA-MB-231 hücrelerine ilk 10 saat içerisinde en yüksek etkisini göstermektedir. Onuncu saatten sonra MCF-7 hücrelerinde anti-kanser ajanlarının etkisinin giderek arttığı, MDA-MB-231 hücrelerinde ise etkinin ilerleyen saatlerde azaldığı göze çarpmaktadır. Bu bulgu, MDA-MB-231 hücrelerinde geçen süre ile birlikte ilaç direncinin ortaya çıkması ile uyumlu gözükmemektedir.

Bir sonraki aşamada taksol ve bleomisin ile muamele edilen meme kanseri hücrelerinde apoptotik hücre ölümü araştırıldı. Apoptoz düzeyi ELIZA-bazlı yaklaşımla ölçüldü. Sitotoksikite ölçümlerinin bulgularında yola çıkarak MCF-7 hücrelerinde daha yüksek hücre ölümü beklenmekteydi. Bununla uyumlu bir şekilde, taksol uygulanan MCF-7 hücrelerinde (bazal düzeyin 3-3.7 katı) MDA-MB-231 hücrelerine (bazal

düzeyin 2.1 kat) göre daha yüksek hücre ölüm bulgusu saptandı. Bleomisine maruz kalan MCF-7 hücrelerinde apoptoz oranı bazal düzeyin 3.5 katına kadar yükselirken, MDA-MB-231 hücrelerinde bu oran nispeten düşük miktarda gözlemlendi (1.5-1.9 kat). Bu bulgular, taksola göre her iki hücre tipinde de daha az toksik gözükken bleomisin uygulaması ile de önemli derecede sitoplazmik nükleozomlar ölçüldüğünü ortaya koymaktadır. Bu sonuç, bleomisin ile muamele edilen hücreler henüz ölmeden yani hücre zarı henüz intakt durumda iken, apoptotik sürecin başladığı ve sitoplazmaya nükleozomların salınmaya başladığını göstermektedir.

Anti-kanser ilaçlara maruz bırakılan hücrelerde, ajanların hücre çoğalması ve hücre ölümü üzerine olan etkilerinin, lincRNA-p21 ve GAS5'in ifadeleri üzerindeki yansımaları araştırıldı. Genel olarak, lncRNA'lar protein kodlayan genlere göre daha az ifade miktarlarında eksprese edilirler [95]. Tez çalışmasında da buna uyumlu olarak lincRNA-p21 ve GAS5 moleküllerinin hücresel ifade düzeyleri, kullanılan referans gene (GAPDH) oranla düşük idi. lncRNA'lar nisbi olarak düşük miktarlarda ifade edilmelerine rağmen, sitotoksik strese cevaben ifade düzeylerinde artış meydana gelmekte ve apoptotik sinyal yollarını etkilemektedir [17]. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin sitotoksik ajanlara verdiği farklı yanıtların lncRNA moleküllerinin ifade düzeylerine de yansıdığı görülmektedir. Çalışmanın aday lncRNA moleküllerinden ilki olan lincRNA-p21'in ifade düzeyi, taksol ve bleomisin uygulanan MCF-7 hücrelerinde önemi ölçüde (2.8 kata kadar) artmıştır. Yapılan çalışmalar, lincRNA-p21'in, p53 proteininin p21'in promotör bölgesine yeterli derecede bağlanması için pivot görevi gören hnRNP-K'yı p21 promotör bölgesine çekerek, p21'in ifadesini arttırdığını bildirmektedir [11]. Bundan yola çıkarak, tez çalışmasında anti-proliferatif etki farklı olsa da benzer oranda hücre ölümüne yol açan ajanların apoptotik etkilerine lincRNA-p21 benzer şekilde aracılık etmiş olabilir. Zira taksol ve bleomisinin G2/S kontrol noktaları aracılığıyla apoptozu uyardığı [96-98] ve p21 molekülünün bu kontrol noktası için gerekli moleküllerden biri olduğu bilinmektedir [68].

Aday lncRNA'lardan bir diğeri olan GAS5 molekülü, glukokortikoid reseptör (GRE) elementini taklit eden bir domain taşır [63]. GAS5, GRE sayesinde DNA'ya bağlanarak GRE'nin düzenlediği genleri etkileyebilir ve bu şekilde hücre döngüsünü baskıladığı düşünülmektedir [63, 64]. Ancak, tez çalışmasında GRE ile ilişkili genlerle

çalışılmadığı için GAS5 molekülün etki mekanizması literatür bilgisi ile sınırlıdır. MCF-7 hücrelerine taksol ve bleomisin anti kanser ajanlarının uygulanması GAS5 molekülünün ifade düzeyini, lincrna-p21 ile karşılaştırıldığında daha düşük oranda (bazal düzeyin 1.5 katı kadar) uyarmıştır. MDA-MB-231 hücrelerinde de benzer bir tablo görülmüştür.

Eksozomlar hücrelerden salınan mikroveziküllerdir ve salındıkları hücrelerin içinde bulundukları koşullara göre eksozomların taşıdıkları kargo moleküllerinin içerikleri değişebilmektedir [15, 79]. Antikanser ajanlarla muamele edilen meme kanseri hücrelerinde GAS5 ve lincrna-p21 moleküllerinin eksozomal miktarları incelendiğinde, hücrelerin sitotoksik ajanlara verdiği yanıtların sadece hücresel bazda kalmayıp eksozom içeriklerine de yansıdığı görülmektedir. Hücresel ifade düzeyinde artmışa paralel olarak, salınan eksozomlarda da ifade düzeyinin arttığı görülmektedir. MCF-7 hücrelerinde, eksozomal lincrna-p21 düzeyi bleomisin uygulanmasında daha yüksek gerçekleşirken (bazal düzeyin 5 katı kadar), GAS5 miktarı taksol ve bleomisin uygulanmasında benzer idi ve artan dozla birlikte bazal düzeyin yaklaşık 6 katı kadar artmıştır. MCF-7 hücrelerinden salınan eksozomlarda lncRNA ifade düzeylerinin hücresel anlatıma göre daha yüksek zenginleşme (enrichment) gösterdiği gözle çarpmaktadır. Bunun nedeni hücrelerin apoptotik süreçte mikroçevredeki diğer hücrelerle apoptotik süreçte rol oynayan lncRNA'lar aracılığı ile iletişim kurması olabilir. Sitotoksik strese maruz kalan MDA-MB-231 hücrelerine ait eksozomlarda incelenen GAS5 molekülünün ifade düzeyinde hücresel bazda olduğu gibi anlamlı bir fark saptanmamıştır. Ancak, lincrna-p21 molekülüne bakıldığında, anti-kanser ajanların lincrna-p21 ifadesinde değişikliğe sebep olduğu görülmektedir. Taksol uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait eksozomal lincrna-p21 molekülünün ifade seviyesi bazal düzeyin yaklaşık olarak 3.5 katına çıkarken, bleomisin uygulananlar hücrelere ait eksozomal lincrna-p21 seviyesi bazal düzeyin 3 katına kadar çıktığı belirlenmiştir.

Çalışmada elde edilen deneysel bulgular MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri arasında farklılıklar göstermektedir. Üçlü-negatif meme kanseri, gen ifade profilleri, histopatolojik özellikleri ve klinik evrede gösterdikleri karakteristik yapılarıyla diğer meme kanserlerinden ayrılan, agresif bir tümör alt tipidir [99-101]. Bu tip tümörler kemoterapiye başlangıç evresinde diğerlerine göre daha iyi cevap verseler de, ilaç

direnci oluşturma ihtimallerinin yüksek olması nedeniyle klinikte tedavi edilmesi daha zordur [93]. Üçlü-negatif meme tümörlerinde düzenlenmesi çoğunlukla anormal seviyede olan wnt sinyal yolağı, kolorektal ve meme kanserlerinde aktif durumdadır [102-104]. Bu sinyal yolağı hücre çoğalmasını uyarıcı yönde etkiler. Wnt sinyal yolağında en etkili molekülün β -katenin olduğu düşünülmektedir. β -katenin Wnt ligandlarının fazla ifade olması, wnt ligand antagonistlerinin az ifade olması veya APC tumor baskılayıcıların kaybı nedeniyle stabil halde kalabilir ve hücre çoğalması sürekli uyarılır [105]. Wnt sinyal yolağının TNBC(Triple Negative Breast Cancer) hücre grubunda, MCF-7 hücrelerini de kapsayan ER+ meme kanseri gibi kanser tiplerine göre daha aktif olduğu gösterilmiştir [106-108]. Ayrıca, wnt/ β -katenin sinyal yolağının aktif olduğu bazal tipli meme kanseri hücrelerinde kötü prognozla ilişkilendirilmiştir [120]. Bu bilgiler ışığında, MDA-MB-231 hücrelerine ait apoptoz verileri ve apoptozla ilişkili aday lncRNA'ların ifade profilleri beklendiği üzere, MCF-7 hücrelerinden daha düşük seviyede gerçekleşmiştir.

Sonuç olarak, tez çalışması sitotoksik ajanların meme kanseri hücrelerinde bazı aday kodlanmayan RNA'ların hem hücresel hem de eksozomal bazda incelendiği ilk özel çalışmadır. Elde edilen veriler, apoptotik mekanizmaları uyaran sitotoksik ajanlarla muamele edilen MCF-7 hücrelerinde cevap olarak lincrna-p21 molekülünün ifadesinde artış olduğunu göstermektedir. GAS5 molekülünde ise nispeten daha az bir artış olduğu saptanmıştır. Ancak, MCF-7 hücre soyuna ait eksozomal lincrna-p21 ve GAS5 ifade düzeyleri anti-kanser ajan uygulamasının ardından en yüksek artışı göstermiştir. MDA-MB-231 hücrelerinde ise sitotoksik ajanların lincrna-p21 ve GAS5 moleküllerinin hücresel ifade düzeylerine sınırlı etki ettiği gözlenirken, eksozomal lincrna-p21 ifadesini uyardığı saptanmıştır. Çalışmadan elde edilen bulgular, uzun kodlamayan RNA'ların ifade profillerinin, moleküler biyolojik işlevi, DNA hasarı ve hücre bölünmesinin durdurulması, hücre tipi ve henüz tanımlanmayan farklı etmenlere bağlı olarak değişiklik gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Aynı zamanda hücre sağkalım ve apoptoz mekanizmalarıyla ilişkili bazı kodlamayan RNA'ların eksozomal ifade profillerinin, salgılandıkları hücrelere ait biyolojik olayları yansıttığını kanıtlamaktadır. İleriki çalışmalarda, transkriptom gibi geniş çaplı fonksiyonel analizler, sitotoksik stresle ilişkili kodlamayan RNA molekülleri hakkında detaylı bilgiler sağlayabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Jacques F, Isabelle S, Rajesh D, Sultan E, Colin M , et al. Cancer incidence and mortality worldwide sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer* 2015; 1: 136 (5).
2. Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group (EBCTCG). Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *Lancet* 2011; 378 (9804): 1707–1716.
3. Cheetham SW, Gruhl F, Mattick JS and Dinger ME. Long noncoding RNAs and the genetics of cancer. *British Journal of Cancer* 2013; 108: 2419–2425.
4. Hu W, Yuan, B., Flygare, J. & Lodish, H. F. Long noncoding RNA-mediated anti-apoptotic activity in murine erythroid terminal differentiation. *Genes Dev.* 2011 15;25(24):2573-8
5. Mourtada-Maarabouni M, Pickard MR, Hedge VL, Farzaneh F, Williams GT. GAS5, a non-protein-coding RNA, controls apoptosis and is downregulated in breast cancer. *Oncogene* 2009; 28 (2): 195-208.
6. Pickard MR, Mourtada-Maarabouni M, Williams GT. Long non-coding RNA GAS5 regulates apoptosis in prostate cancer cell lines. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1832 (10): 1613-1623.
7. Lee S, Kopp F, Chang TC, Sataluri A, Chen B, Sivakumar S, Yu H, Xie Y, Mendell JT. Noncoding RNA NORAD Regulates Genomic Stability by Sequestering PUMILIO Proteins. *Cell* 2016; 164 (1-2): 69-80.
8. Chang L, Li C, Lan T, Wu L, Yuan Y, Liu Q, Liu Z. Decreased expression of long non-coding RNA GAS5 indicates a poor prognosis and promotes cell proliferation and invasion in hepatocellular carcinoma by regulating vimentin. *Mol Med Rep* 2016; 13(2):1541-1550.
9. Gao J, Liu M, Zou Y, Mao M, Shen T, Zhang C, Song S, Sun M, Zhang S, Wang B, Zhu D, Li P. Long non-coding RNA growth arrest-specific transcript 5 is involved in ovarian cancer cell apoptosis through the mitochondria-mediated apoptosis pathway. *Oncol Rep* 2015; 34 (6): 3212-3221.
10. Cao S, Liu W, Li F1, Zhao W, Qin C. Decreased expression of lncRNA GAS5 predicts a poor prognosis in cervical cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7 (10): 6776-6783.

11. Dimitrova N, Zamudio JR, Jong RM, Soukup D, Resnick R et al. lincrna-p21 activates p21 in cis to promote Polycomb target gene expression and to enforce the G1/S checkpoint. *Mol Cell* 2014; 54 (5): 777-790.
12. Işın M, Uysaler E, Özgür E, Köseoğlu H, Şanlı Ö, Yücel ÖB, Gezer U, Dalay N. Exosomal lncRNA-p21 levels may help to distinguish prostate cancer from benign disease. *Front Genet* 2015; 6: 168.
13. Tang SS, Zheng BY, Xiong XD. lincrna-p21 implications in human diseases. *Int J Mol Sci* 2015; 16 (8): 18732-18740.
14. Keller S, Sanderson MP, Stoeck A, Altevogt P. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunol Lett* 2006; 107 (2): 102-108.
15. Olivier G J, Marianne C V, Yong C, Pieter V, Hendrik G, et al. Cellular Stress conditions are in the protein and RNA content of endothelial cell-derived exosomes. *J Extracell Vesicles* 2012; 16: 1.
16. Yanez-Mo M, Siljander P R, Andreu Z, Zavec A B, Borrás F, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*. 2015; 4: 27066
17. Ozgur E, Mert U, Isin M, Okutan M, Dalay N, Gezer U. Differential expression of long non-coding RNAs during genotoxic stress-induced apoptosis in HeLa and MCF-7 cells. *Clin. Exp. Med* 2013; 13: 119–126.
18. <https://www.cancer.gov/types/breast/patient/breast-treatment-pdq#section/all>
Alınma tarihi Ocak 2017
19. Byler S, Goldgar S, Heerboth S, Leary M, Housman G, Moulton K, Sarkar S. Genetic and epigenetic aspects of breast cancer progression and therapy. *Anticancer Res*. 2013; 34 (3): 1071-1077
20. Viale G. The current state of breast cancer classification. *Ann Oncol* 2012; 23: 207-210
21. Hsiao YH, Chou MC, Fowler C, Mason JT, Man Y. Breast cancer heterogeneity: mechanisms, proofs, and implications. *J Cancer* 2010; 1: 6-13.
22. Tanja O, Snjezana GS, Erika M, Barbara M, Simona B. Triple negative breast cancer – prognostic factors and survival *Radiol Oncol*. Mar 2011; 45(1): 46–52
23. Polyak K. Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest*. 2007; 117 (11): 3155-3161.

- 24.Spremulli EN, Dexter DL. Human tumor cell heterogeneity and metastasis. *J Clin Oncol.* 1983; 1 (8): 496-509
- 25.Fidler IJ. Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res.* 1978; 38 (9): 2651-2660
- 26.Hengbo Z, Deepika N, Heide F. Intravital Insights into Heterogeneity, Metastasis, and Therapy Responses. *Seminars In Cell Developmental Biology* 2016
- 27.Shany K, Mohamed B. Breast Tumor Heterogeneity: Source of Fitness, Hurdle for Therapy. *Mol. Cell* 2015; 60 (4): 537-546
- 28.Stephens PJ, Tarpey PS, Davies H, Van Loo P, Greenman C, et al. The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature* 2012; 486 (7403): 400-404
- 29.Curtis C, Shah SP, Chin S, Turashvili G, Rueda OM, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* 2012; 486 (7403): 346-352
- 30.The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2012; 490 (7418): 61-70.
- 31.Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65 (16): 7065-7070
- 32.Elsheikh SE, Green AR, Rakha EA, Powe DG, Ahmed RA, et al. Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors, and patient outcome. *Cancer Res* 2009; 69 (9): 3802-3809.
- 33.Rodenhiser DI, Andrews J, Kennette W, Sadikovic B, Mendlowitz A, et al. Epigenetic mapping and functional analysis in a breast cancer metastasis model using whole-genome promoter tiling microarrays. *Breast Cancer Res* 2008; 10 (4): R62
34. ENCODE Project Consortium, Birney E, Stamatoyannopoulos JA et al. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 2007; 447(7146):799-816
35. Prasanth KV and Spector DL. Eukaryotic regulatory RNAs: an answer to the 'genome complexity' conundrum. *Genes Dev* 2007 1;21(1):11-42.
36. Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J, Frith MC, Maeda N, Oyama R et al. The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* 2005; 309 (5740): 1559-1563

37. Mercer TR, Dinger ME, Sunkin SM, Mehler MF, Mattick JS. Specific expression of long noncoding RNAs in the mouse brain. *PNAS* ;105 (2): 716-721
38. Pang KC, Dinger ME, Mercer TR, Malquori L, Grimmond SM, Chen W, Mattick JS. Genome-wide identification of long noncoding RNAs in CD8⁺ T cells *J Immunol* 2009; 15; 182 (12): 7738-7748
39. Cabili MN, Trapnell C, Goff L, Koziol M, Tazon-Vega B, Regev A, Rinn JL. Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses. *Genes Dev* 2001; 25 (18): 1915-1927
40. Cheetham SW, Gruhl F, Mattick JS and Dinger ME. Long noncoding RNAs and the genetics of cancer. *British Journal of Cancer* 2013; 108, 2419–2425.
41. Ekta K, Yao F, Dimple C, Francesca D, Mark AR, Mark G. Role of non-coding sequence variants in cancer. *Nature Reviews Genetics* 2016; 17: 93–108
42. Derrien T, Johnson R, Bussotti G, Tanzer A, Djebali S, et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res.* 2012; 22(9): 1775–1789.
43. Tsoi LC, Iyer MK, Stuart PE, Swindell WR, Gudjonsson JE, et al. Analysis of long non-coding RNAs highlights tissue-specific expression patterns and epigenetic profiles in normal and psoriatic skin. *Genome Biol* 2015; 16: 24.
44. Wenting W, Erin K, Yangyang H, Xi R, Hongji D, et al. Tissue-specific Co-expression of Long Non-coding and Coding RNAs Associated with Breast Cancer. *Scientific Reports* 2016; 6, 32731
45. Kimura T, Aikata H, Takahashi S, Takahashi I, Nishibuchi I, Doi Y, et al. Stereotactic body radiotherapy for patients with small hepatocellular carcinoma ineligible for resection or ablation therapies. *Hepatol Res* 2015; 45 (4): 378–386.
46. Yuan SX, Tao QF, Wang J, Yang F, Liu L, Wang L, et al. Antisense long non-coding RNA PCNA-AS1 promotes tumor growth by regulating proliferating cell nuclear antigen in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 2014; 349 (1): 87–94
47. Takahashi H, Carninci P. Widespread genome transcription: new possibilities for RNA therapies. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 452 (2): 294–301
48. Kotake Y, Nakagawa T, Kitagawa K, Suzuki S, Liu N, et al. Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15(INK4B) tumor suppressor gene. *Oncogene* 2011; 30: 1956–1962

49. Kawakami T, Zhang C, Taniguchi T, Kim CJ, Okada Y, et al. Characterization of loss-of-inactive X in Klinefelter syndrome and female-derived cancer cells. *Oncogene* 2004; 23: 6163–6169.
50. Nakano S, Murakami K, Meguro M, Soejima H, Higashimoto K, et al. Expression profile of LIT1/KCNQ1OT1 and epigenetic status at the KvDMR1 in colorectal cancers. *Cancer Sci* 2006; 97: 1147–1154
51. Gupta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature* 2010; 464: 1071–1076
52. Huarte M, Guttman M, Feldser D, Garber M, Koziol MJ, et al. A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response *Cell* 2010; 142 (3): 409-419
53. Yang F, Bi J, Xue X, Zheng L, Zhi K, Hua J, Fang G. Up-regulated long non-coding RNA H19 contributes to proliferation of gastric cancer cells. *FEBS J* 2012; 279: 3159–3165
54. Leygue E, Dotzlaw H, Watson PH, Murphy LC. Expression of the steroid receptor RNA activator in human breast tumors. *Cancer Res* 1999; 59: 4190–4193
55. Redon S, Reichenbach P, Lingner J. The non-coding RNA TERRA is a natural ligand and direct inhibitor of human telomerase. *Nucleic Acids Res* 2010; 38: 5797–5806
56. Deng QJ, Xie LQ, Li H. Overexpressed MALAT1 promotes invasion and metastasis of gastric cancer cells via increasing EGFL7 expression. *Life Sci* 2016; 157: 38-44.
57. Jadaliha M, Zong X, Malakar P, Ray T, Singh DK et al. Functional and prognostic significance of long non-coding RNA MALAT1 as a metastasis driver in ER negative lymph node negative breast cancer. *Oncotarget* 2016; 7 (26): 40418-40436.
58. Wang SH, Zhang WJ, Wu XC, Zhang MD, Weng MZ. Long non-coding RNA Malat1 promotes gallbladder cancer development by acting as a molecular sponge to regulate miR-206. *Oncotarget* 2016; 7 (25): 37857-37867.
59. Schneider C, King RM, Philipson L. Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. *Cell* 1988; 54 (6): 787-793.
60. Muller AJ, Chatterjee S, Teresky A, Levine AJ. The gas5 gene is disrupted by a frameshift mutation within its longest open reading frame in several inbred mouse strains and maps to murine chromosome 1. *Mamm Genome* 1998; 9 (9): 773-774

61. Raho G, Barone V, Rossi D, Philipson L, Sorrentino V. The gas 5 gene shows four alternative splicing patterns without coding for a protein. *Gene* 2000; 256 (1-2): 13-7.
62. Smith CM, Steitz JA. Classification of gas5 as a multi-small-nucleolar-RNA (snoRNA) host gene and a member of the 5'-terminal oligopyrimidine gene family reveals common features of snoRNA host genes. *Mol Cell Biol.* 1998;18 (12): 6897-6909.
63. Pickard MR, Williams GT. The hormone response element mimic sequence of GAS5 lncRNA is sufficient to induce apoptosis in breast cancer cells. *Oncotarget* 2016; 7 (9): 10104–10116.
64. Tomoshige K, Darrell EH, Takamasa I, Nancy N, George P. Noncoding RNA Gas5 Is a Growth Arrest and Starvation-Associated Repressor of the Glucocorticoid Receptor. *Sci Signal.* 2010; 3 (107): ra8.
65. Dimitrova N, Zamudio JR, Jong RM, Soukup D, Resnick R et al. lincrna-p21 activates p21 in cis to promote Polycomb target gene expression and to enforce the G1/S checkpoint. *Mol Cell* 2014; 54 (5): 777-790.
66. Yoon JH, Abdelmohsen K, Srikantan S, Yang X, et al. lincrna-p21 suppresses target mRNA translation. *Mol Cell* 2012; 47(4): 648-655.
67. Ozgur E, Mert U, Isin M, Okutan M, Dalay N, Gezer U. Differential expression of long non-coding RNAs during genotoxic stress-induced apoptosis in HeLa and MCF-7 cells. *Clin. Exp. Med* 2013; 13:119–126.
68. Hall JR, Messenger ZJ, Tam HW, Phillips SL, Recio L, Smart RC. Long noncoding RNA lincrna-p21 is the major mediator of UVB-induced and p53-dependent apoptosis in keratinocytes. *Cell Death Dis* 2015; 6: e1700.
69. Zhai H, Fesler A, Schee K, Fodstad O, Flatmark K, Ju J. Clinical significance of long intergenic noncoding RNA-p21 in colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2013;12 (4): 261-266.
70. Işın M, Uysaler E, Özgür E, Köseoğlu H, Şanlı Ö, Yücel ÖB, Gezer U, Dalay N. Exosomal lncRNA-p21 levels may help to distinguish prostate cancer from benign disease. *Front Genet* 2015; 6:168
- Raiborg C, Rusten TE, Stenmark H. Protein sorting into multivesicular endosomes. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15(4): 446-455.
71. Raiborg C, Rusten TE, Stenmark H. Protein sorting into multivesicular endosomes. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15(4): 446-455.0

- 72.Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO: Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007; 9:654-659.
- 73.Clotilde T, Laurence Z, Sebastian A. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature Reviews Immunology* 2002; 2(8):569-79.
- 74.Mullock BM, Bright NA, Fearon CW, Gray SR, Luzio JP. Fusion of lysosomes with late endosomes produces a hybrid organelle of intermediate density and is NSF dependent. *Cell Biol* 1988; 140 (3): 591-601.
- 75.Chu Z, Witte DP, Qi X Saposin C-LBPA interaction in late-endosomes/lysosomes. *Exp Cell Res* 2005; 303 (2): 300-307.
- 76.Srivastava, P. Interaction of heat-shock proteins with peptides and antigen-presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annu. Rev Immunol.* 2002; 20: 395–425.
- 77.Hedlund M, Nagaeva O, Kargl D, Baranov V, Mincheva-Nilsson L. Thermal- and Oxidative Stress Causes Enhanced Release of NKG2D Ligand-Bearing Immunosuppressive Exosomes in Leukemia/Lymphoma T and B Cells. *PLoS One* 2011; 6 (2): e16899.
- 78.Batagov AO, Kuznetsov VA, Kurochkin IV. Identification of nucleotide patterns enriched in secreted RNAs as putative cis-acting elements targeting them to exosome nano-vesicles. *BMC Genomics* 2011; 12 (Suppl 3): S18.
79. Gezer U, Özgür E, Cetinkaya M, Isin M, Dalay N. Long non-coding RNAs with low expression levels in cells are enriched in secreted exosomes. *Cell Biol Int.* 2014; 38 (9): 1076-1079.
80. Lorena U, Alessandro M, Sandra B, Alessandro B, Krizia S, et al. Signaling Pathways in Exosomes Biogenesis, Secretion and Fate. *Genes (Basel)* 2013; 4 (2): 152–170
81. Zhao H, Yang L, Baddour J, Achreja A, Bernard V, et al. Tumor microenvironment derived exosomes pleiotropically modulate cancer cell metabolism. *Elife* 2016 ;5:e10250
82. Lespagnol A, Duflaut D, Beekman C, Blanc L, Fiucci G, Marine JC, et al. Exosome secretion, including the DNA damage-induced p53-dependent secretory pathway, is severely compromised in TSAP6/Steap3-null mice. *Cell Death Differ* 2008; 15 (11): 1723–1733.

83. Yu X, Harris SL, Levine AJ. The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. *Cancer Res* 2006; 66 (9): 4795–4801.
84. Kharaziha P, Ceder S, Li Q, Panaretakis T. Tumor cell-derived exosomes: a message in a bottle. *Biochim Biophys Acta* 2012;1826 (1): 103-111.
85. <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancers-in-general/treatment/cancer-drugs/paclitaxel>. Alınma tarihi Ocak 2017
86. <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/chemotherapy/how-chemotherapy-drugs-work.html>. Alınma tarihi Ocak 2017
87. Spencer CM, Faulds D. Paclitaxel. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in the treatment of cancer. *Drugs* 1994; 48 (5): 794-847.
88. Jingyang C, Minas KG, Grace K, and Joanne S. Mechanistic studies on bleomycin-mediated DNA damage: multiple binding modes can result in double-stranded DNA cleavage. *Nucleic Acids Res* 2008; 36 (11): 3781–3790.
89. Dorr RT. Bleomycin pharmacology: mechanism of action and resistance, and clinical pharmacokinetics. *Semin Oncol*. 1992; 19 (2 Suppl 5):3-8
90. Hecht SM. Bleomycin: new perspectives on the mechanism of action. *J Nat Prod* 2000; 63 (1): 158-168.
91. <https://www.drugs.com/monograph/bleomycin-sulfate.html>. Alınma Tarihi Ocak 2017
92. Wang TH1, Wang HS, Soong YK. Paclitaxel-induced cell death: where the cell cycle and apoptosis come together. *Cancer* 2000; 88 (11): 2619-2628
93. Carey L, Winer E, Viale G, Cameron D, Gianni L. Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience? *Nat Rev Clin Oncol* 2010; 7: 683–692.
94. Tanja O, Snjezana GS, Erika M, Barbara M, Simona B. Triple negative breast cancer – prognostic factors and survival *Radiol Oncol*. 2011; 45(1): 46–52
95. Gwyn T. Williams, Farzin Farzaneh. Are snoRNAs and snoRNA host genes new players in cancer? *Nature Reviews Cancer* 2012; 12: 84-88.
96. Kaneko M, Matsuda D, Ohtawa M. Potentiation of bleomycin in jurkat cells by fungal pycnidione. *Biol Pharm Bull* 2012; 35 (1): 18-28.
97. Yen HC, Li SH, Majima HJ. Up-regulation of antioxidant enzymes and coenzyme Q (10) in a human oral cancer cell line with acquired bleomycin resistance. *Free Radic Res* 2011; 45 (6): 707-716.

98. Wang TH¹, Wang HS, Soong YK. Paclitaxel-induced cell death: where the cell cycle and apoptosis come together. *Cancer* 2000; 88 (11): 2619-2628
99. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2010; 363: 1938–1948.
100. Elsayaf Z, Sinn HP. Triple-Negative Breast Cancer: Clinical and Histological Correlations. *Breast Care (Basel)* 2011; 6: 273–278.
101. Liedtke C, Bernemann C, Kiesel L, Rody A. Genomic Profiling in Triple-Negative Breast Cancer. *Breast Care (Basel)* 2013; 8: 408–413.
102. Clevers H, Nusse R. Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell* 2012; 149: 1192–1205.
103. Prosperi JR, Goss KH. A Wnt-ow of opportunity: targeting the Wnt/beta-catenin pathway in breast cancer. *Curr Drug Targets* 2010; 11: 1074–1088.
104. King TD, Suto MJ, Li Y. The Wnt/beta-catenin signaling pathway: a potential therapeutic target in the treatment of triple negative breast cancer. *J Cell Biochem* 2012; 113: 13–18.
105. Prosperi JR, Khramtsov AI, Khramtsova GF, Goss KH. Apc mutation enhances PyMT-induced mammary tumorigenesis. *PLoS One* 2011; 6: e29339
106. Lopez-Knowles E, Zardawi SJ, McNeil CM, Millar EK, Crea P, et al. Cytoplasmic localization of beta-catenin is a marker of poor outcome in breast cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010; 19: 301–309.
107. Khramtsov AI, Khramtsova GF, Tretiakova M, Huo D, Olopade OI, et al. Wnt/beta-catenin pathway activation is enriched in basal-like breast cancers and predicts poor outcome. *Am J Pathol* 2010; 176: 2911–2920.
108. Geyer FC, Lacroix-Triki M, Savage K, Arnedos M, Lambros MB, et al. beta-Catenin pathway activation in breast cancer is associated with triple-negative phenotype but not with CTNNB1 mutation. *Mod Pathol* 2011; 24: 209–231.

FORMLAR

ETİK KURUL KARARI